

Resumen

En el presente estudio se parte de la problemática que representa la existencia de triazinas en aguas subterráneas. A partir de este hecho se proponen soluciones basadas en la bioaumentación con microorganismos degradadores de las mismas.

Se ha trabajado, por un lado con *Pseudomonas sp.* strain ADP las cuales se han aclimatado progresivamente a medios con salinidad similar a la del agua subterránea del emplazamiento en cuestión, y por otro lado y paralelamente se ha aislado una cepa bacteriana degradadora de triazinas indígenas presente en el propio emplazamiento, desierto del Negev (Israel).

Para desarrollar estos estudios, inicialmente fué necesario desarrollar y optimizar una metodología de extracción de atrazina en aguas de diferente salinidad y analisis de los extractos obtenidos mediante HPLC.

En los experimentos con *Pseudomonas sp.* strain ADP se ha partido de experimentos realizados en medio salino de cultivo y se ha aumentado progresivamente la salinidad en experimentos por triplicado con controles abióticos y muertos. Los resultados muestran degradación de atrazina con *Pseudomonas sp.* strain ADP aunque está se presenta con un retraso proporcional a la salinidad. En los experimentos con cepa bacteriana degradadora de triazinas indígenas se ha observado degradación significativa a partir del día 56.

Se han realizado experimentos abióticos en biocarriers minerales con agua salina sin atrazina con objeto de determinar la capacidad de los mismos para la fijación de fósforo y carbono orgánico. Mediante balance de masas se ha observado la disminución de fosfatos y carbono. Un estudio microscópico en los materiales antes y después del tratamiento permite determinar la presencia de cristales en forma de aguja ricos en fósforo que se asimilan a fosfatos. Ello indica la precipitación como posible mecanismo de fijación sobre la superficie del biocarrier.





Sumario

Resumen_____	1
Sumario_____	3
1.- Glosario_____	7
2.- Prefacio_____	9
3.- Introducción_____	11
3.1.- Objetivo principal y secundarios.....	11
4.- Fundamento teórico_____	13
4.1.- Introducción.....	13
4.2.- Características de la atrazina.....	16
4.3.- Características de microorganismos.....	20
5.- Procedimiento experimental_____	25
5.1.- Fundamentos extracción en fase sólida.....	25
5.2.- Fundamentos de la cromatografía líquida de alta eficiencia, HPLC.....	30
5.3.- Metodología experimental.....	32
5.3.1.- Reactivos.....	32
5.3.2.- Soluciones salinas.....	33
5.3.3.- Solución madre y patrones ATZ.....	36
5.3.4.- Análisis HPLC, recta patrón.....	39
5.3.5.- Optimización SPE.....	42
5.3.5.1.- Optimización etapa de evaporación.....	42
5.3.5.2.- Optimización etapa de reconstitución.....	44





5.3.5.3-Optimización protocolo extracción.....	45
5.3.5.4-Optimización del patrón interno.....	45
6.- Estudio de la biodegradación de atrazina mediante <i>Pseudomonas sp.</i> strain ADP_____	51
6.1.- Diseño experimental y metodología.....	51
6.2.- Resultados.....	54
7.- Estudio de la biodegradación de atrazina mediante bacterias Indígenas_____	67
7.1.- Diseño experimental y metodología.....	67
7.2.- Resultados.....	69
8.- Experimentos con biocarriers_____	73
8.1.- Diseño experimental y metodología.....	73
8.2.- Resultados.....	76
9.- Evaluación económica_____	87
9.1.- Presupuesto del proyecto.....	87
9.1.1.- Inversión en equipos y material.....	88
9.1.2.- Recursos humanos.....	88
9.1.3.- Material oficina.....	89
9.1.4.- Presupuesto global.....	90
10.- Conclusiones_____	93
11.- Referencias_____	95
12.- Agradecimientos_____	99





1.- Glosario

ATZ: Atrazina

MeOH: Metanol

ACN: Acetonitrilo

H₂O MilliQ: Agua suprapura calidad Milli Q

FM: Fase móvil (65 % H₂O MilliQ 35% ACN)

DCM: Diclorometano

DCM-MeOH: Mezcla di-clorometano y metanol

465: Solución Salina 465

465i: Solución Salina 465 con 1g/l citrato sódico

GW: Solución salina Israel

SPE: Extracción en fase sólida

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficiencia

TOC: Carbono orgánico total

CV: Coeficiente de variación, equivalente a la desviación típica dividida por el promedio

DSMZ: The German Resource Center for Biological Material

CTM: Centre Tecnològic de Manresa





2.- Prefacio

El uso de agroquímicos por periodos extensos, de manera indiscriminada y abusiva es hoy en día una problemática de ente mundial. Cambios en las técnicas agrícolas han provocado que el uso de agroquímicos se incremente de manera importante, incluyendo insecticidas, pesticidas, fungicidas y herbicidas.

Este uso de pesticidas y herbicidas cada vez más frecuente, repercute de manera negativa en el medio ambiente, por ejemplo, a través de la contaminación de las aguas tanto superficiales como subterráneas o incluso dando lugar a efectos adversos que pueden inducir modificaciones genéticas en receptores de los ecosistemas.

Entre la gran variedad de herbicidas se encuentra la atrazina, frecuentemente utilizada en industrias como la de caña de azúcar, maíz o sorgo. Aunque se ha demostrado por medio de diversos estudios su elevada toxicidad y persistencia en el ambiente, y pese a que su uso se ha prohibido en la Unión Europea se sigue utilizando como herbicida en muchos otros países de todo el mundo.

Por ello, se busca desarrollar nuevas técnicas capaces de eliminar la atrazina mediante reacciones de degradación microbiana, convirtiéndose estas técnicas novedosas en herramientas fundamentales para el desarrollo de procesos de biorremediación en aguas subterráneas.

El presente proyecto se engloba dentro de un proyecto europeo del 7º Programa Marco (AQUAREHAB) que se realiza en el departamento de ingeniería química de la UPC y Fundació CTM, Centre Tecnològic.





3.- Introducción

3.1.- Objetivo principal y secundarios

El objetivo principal del proyecto es estudiar la biodegradación de atrazina como técnica de remediación de aguas subterráneas contaminadas por este pesticida con concentraciones elevadas de salinidad así como evaluar y determinar las condiciones adecuadas para un mayor crecimiento de las cepas bacterianas utilizadas para la biodegradación de la atrazina.

Se llevan a cabo dos estudios batch en paralelo, por un lado con comunidad microbiana indígena del emplazamiento contaminado y por otro lado con una cepa comercial, concretamente con *Pseudomonas* sp. strain ADP.

Dentro del proyecto AQUAREHAB se desarrollarán y evaluarán materiales basados en mezclas de carbón activado y carbonato de calcio que promuevan la adsorción y degradación de triazinas en aguas subterráneas, estos futuros materiales se denominan Biocarriers.

Como objetivos secundarios se considera el desarrollo y la optimización de las condiciones de análisis y de las técnicas de extracción en fase sólida para la cuantificación de atrazina y una primera evaluación de los biocarriers como materiales potenciales para promover la degradación de la atrazina.





4.- Fundamento Teórico

4.1.-Introducción

Una de las características que mejor define la sociedad actual en lo que se entiende por países desarrollados es la utilización de diversos productos químicos. Estos productos químicos impactan directamente o a través de sus residuos sobre el medio.

Hasta no hace mucho tiempo, el vertido de los contaminantes en la naturaleza era el medio o forma de eliminarlos. Hoy en día, la capacidad auto-depuradora del medio ambiente ha dejado de ser suficiente, se han sobrepasado con creces los niveles permitidos, haciendo inservibles los recursos naturales y alterando sus características, por todo ello surge la necesidad de desarrollar metodologías para eliminación y/o reciclaje de estos contaminantes y reducir así su impacto en el Medio Ambiente.

El origen principal de los contaminantes en el Medio Ambiente, son los procedentes de la industria y la agricultura y en menor medida los provocados por la propia población.

La práctica mundial del uso de Agroquímicos por períodos extensos, de manera indiscriminada y abusiva es uno de los mayores factores de contaminación ambiental.

En los últimos 25 años la producción agrícola ha aumentado en un 50% gracias a un incremento del 30% en el consumo de fertilizantes y de un 1500% en el de plaguicidas.

Los plaguicidas más preocupantes desde el punto de vista medioambiental, son los denominados no biodegradables o persistentes ya que, en caso de no recibir un tratamiento específico para su destrucción o inertización, pueden producir una



serie de daños muy diversos e irreversibles que van desde el deterioro o desaparición de un entorno determinado hasta la alteración de la salud de los individuos que viven en dicho entorno.

Durante el ciclo del agua se pueden producir alteraciones en la calidad de la misma. La lluvia y las aguas de riego pueden arrastrar contaminantes atmosféricos o presentes en el suelo, como pesticidas y/o herbicidas, que acaben disueltos en la hidrosfera teniendo especial importancia el caso de las aguas subterráneas que tienen una menor renovación.

El movimiento de estos compuestos desde la superficie del suelo hasta las aguas es un proceso complicado. Para entender cómo se comporta un plaguicida o herbicida en el ambiente se necesita conocer cierta información sobre las propiedades físico-químicas de la molécula y su mecanismo de transporte, así como las características medio ambientales y la geografía del lugar en el que se le encuentra.

La dinámica de interacción del compuesto con el medio acuático y terrestre es bastante compleja y depende de una combinación de procesos físicos-químicos y biológicos.

Entre los procesos físico-químicos destaca la lixiviación debida a la solubilidad, la adsorción-desorción con el suelo y la volatilización, que marcan la preferencia del medio en el que predominará el contaminante (figura 4.1).

Entre los procesos de descomposición estrictamente químicos que se pueden producir en el agua se incluyen la ionización, hidrólisis, oxidación química y la fotodescomposición. Este último, es el proceso predominante en la degradación natural de muchos compuestos, sin embargo no actúa en el caso de las aguas subterráneas.



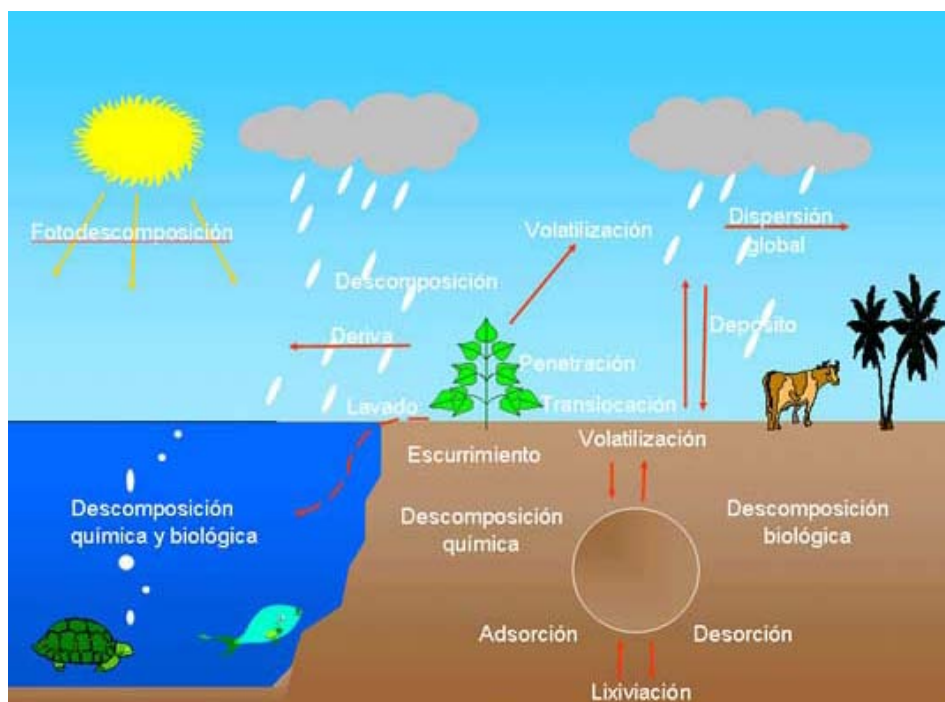


Figura 4.1: Posibles mecanismos de transporte y transformación de plaguicidas en el ambiente.

Algunos pesticidas y herbicidas, como es el caso de la atrazina, son biodegradables por la acción de microorganismos presentes en el agua. Las condiciones ambientales, como la concentración de oxígeno disuelto, pH, salinidad y temperatura, influyen en el número de microorganismos y en la velocidad de biodegradación de los pesticidas en medio acuoso.



4.2.- Características de la atrazina

La atrazina, (2-cloro-4-(etilamino)-6-(isopropilamino)-s-triazina) es un herbicida selectivo perteneciente a la familia de las s-triazinas. Estructuralmente esta constituida por una anillo hexagonal, aromático y simétrico formado por tres átomos de carbón y otros tres de nitrógeno ocupando posiciones alternas.

Fue, y aunque en muchos países se ha prohibido o limitado su utilización, es mundialmente usada, frecuentemente en conjunto con otros herbicidas y derivados de las triazinas (figura 4.2) para el control de malas hierbas y hierbas foliares en la agricultura, especialmente en la agricultura del maíz, caña de azúcar, sorgo así como en la plantación de coníferas de reforestación (US Environmental Protection Agency).

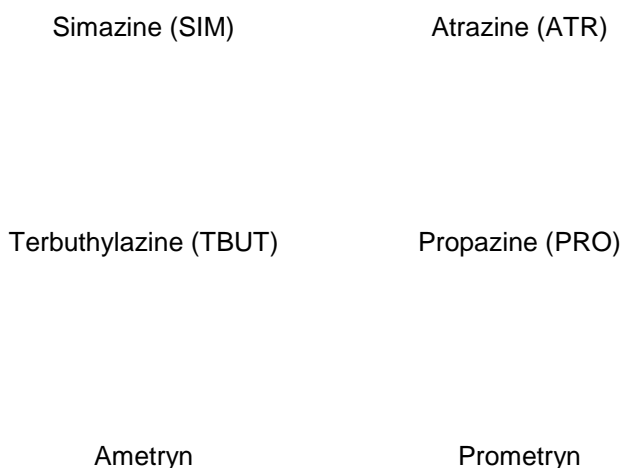


Figura 4.2: Derivados de las triazinas.

La atrazina es un relevante contaminante del Medio Ambiente, especialmente de aguas superficiales y subterráneas.



Las propiedades ambientales más relevantes de la atrazina se plasman en la siguiente tabla:

Tabla 4.1: Propiedades físico-químicas y biológicas de la atrazina. (Syracuse Research Corporation's Interactive PhysProp Database: <http://www.syrres.com/what-we-do/databaseforms.aspx?id=386> (Hildebrandt et al. 2007))

<i>Propiedad (unidades)</i>	<i>Valor</i>
Solubilidad (mg/l) a 20° C	33
K_{oc} (l kg ⁻¹)	93
pK _a	1,68
Presión de vapor (mm Hg)	3·10 ⁻⁷
Vida media degradación hidrólisis (días)	30
Vida media degradación aeróbica (días)	146
Vida media degradación anaeróbica (días)	159

Como puede observarse en la tabla superior (tabla 4.1) se trata de un pesticida de solubilidad baja y preferencia por los suelos moderada, una volatilidad muy baja y una persistencia elevada. Sus características justifican su elevada presencia y persistencia en el agua subterránea.

Comparando la toxicidad de hasta 40 herbicidas diferentes, estudios llegaron a la conclusión que la toxicidad de la atrazina era la más elevada y peligrosa para el medio de todas las triazinas, pudiendo producir alteraciones en la estructura y funcionalidad de las comunidades.

La atrazina es un inhibidor del fotosistema II, acaba con las malas hierbas y todas aquellas plantas susceptibles mediante enlace quinome-proteico y la inhibición de la fotosíntesis del electrón transporte. La planta muere por inanición y el daño oxidativo causado por un fallo en el proceso de transporte de electrones.

Aunque la atrazina tenga efectos tóxicos, sus metabolitos, incluidos el dietilatrazina y el diisopropilatrazina se han asumido como mucho menos tóxicos y



por este motivo surge la búsqueda de métodos para la degradación de la atrazina y obtención de sus metabolitos (Mandelbaum et al. 1995; Guzzella et al. 2003) .

La formación de metabolitos de triazinas se debe principalmente a los procesos bioquímicos, como desalquilación, hidroxilación y decloración; desaminación y escisión del anillo (figura 4.3).

La degradación no siempre produce una menor fitotoxicidad de los compuestos. El metabolito desalquilado puede ser considerado más tóxico que la triazina de la que proviene debido a que son más solubles en agua y más móviles pero no es el caso de la atrazina, la cual, como se ha comentado anteriormente representa la triazina más toxica incluidos sus posibles metabolitos (deetilatrizona (DEA), deisopropilatrizona (DIA)) (Mandelbaum et al. 1995; Guzzella et al. 2003).

La desinfección con cloro de la atrazina elimina sus propiedades herbicidas y disminuye así su toxicidad. Sus compuestos hidroxilados (hidroxiatrizona, (HYA)) tienen menor solubilidad en agua y se consideran menos tóxicos, porque están más vinculados a la materia orgánica del suelo (Jones et al. 1982; Winkelmann and Klaine 1991; Katz et al. 2000).

La hidroxilación es considerada como una de las vías principales de la degradación de atrazina, en condiciones aerobias y anóxicas (Winkelmann and Klaine 1991).



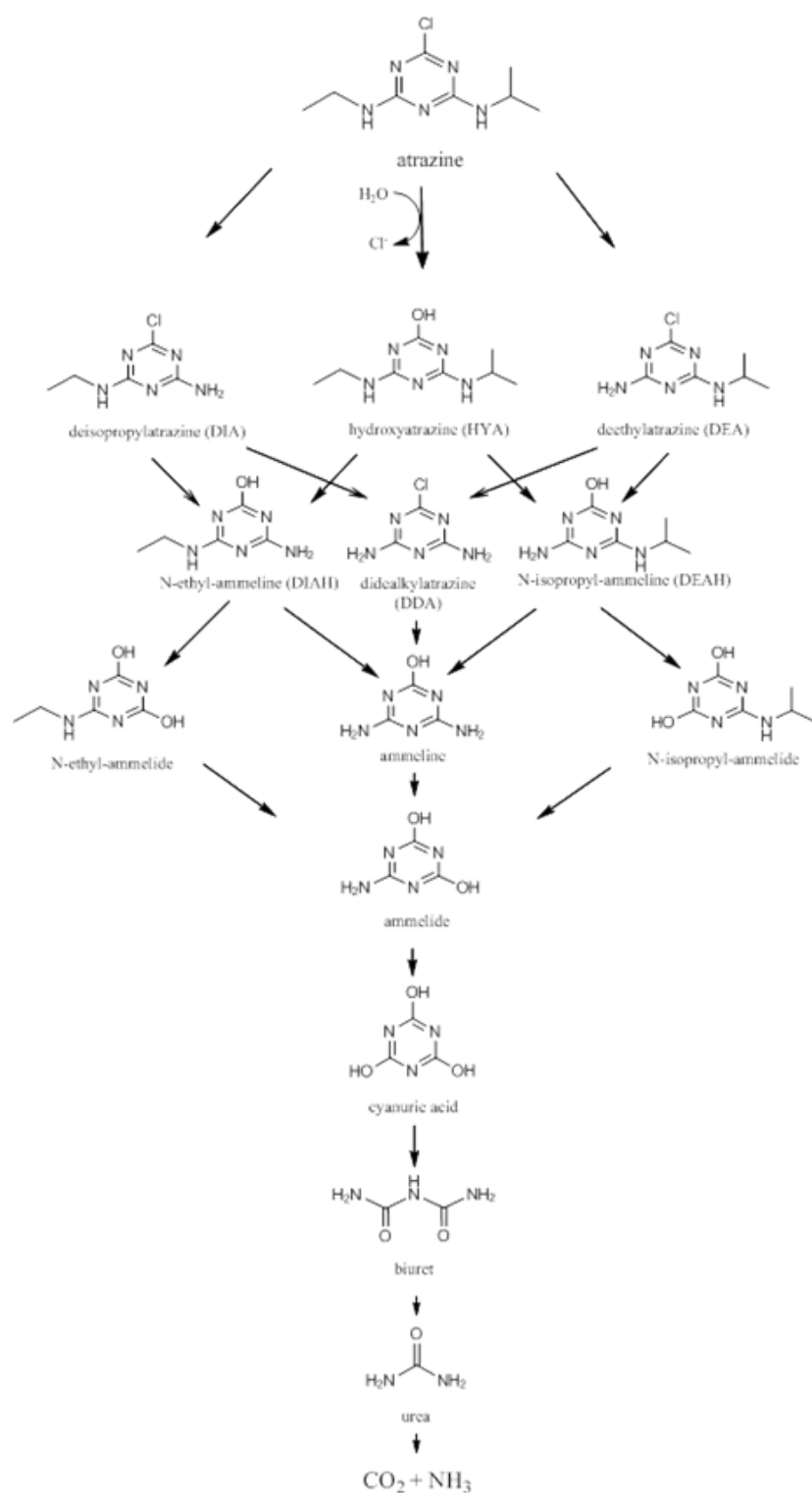


Figura 4.3: Vías de degradación de la atrazina



4.3.-Características de Microorganismos

Algunos estudios, han demostrado la habilidad y capacidad de algunos microorganismos para degradar la atrazina parcial o totalmente a dióxido de carbono y amonio (*Wackett et al. 2002*).

Numerosos estudios afirman la posibilidad de la degradación de la atrazina mediante el uso de microorganismos y de entre todas las bacterias capaces de ello se debe destacar la actividad de las *Pseudomonas sp.* strain ADP, las cuales, en suelos contaminados con atrazina muestran mineralización completa del anillo triazínico.

Pseudomonas sp. strain ADP es la mejor cepa bacteriana caracterizada capaz de degradar la atrazina y además se ha demostrado que incluso puede actuar bajo condiciones de nitrógeno limitadas (*Katz et al. 2000*).

Normalmente el efecto del nitrógeno es relevante en la degradación de los herbicidas mediante el uso de cepas bacterianas para su bioremediación pero en el caso de las *Pseudomonas sp.* strain ADP son capaces de degradar la atrazina teniendo a esta como única fuente de nitrógeno e incluso crecer usando fenol como fuente de carbono (*Vargha et al. 2005*).

Pseudomonas sp. strain ADP fue una de las primeras bacterias que se ha utilizado y se describe su funcionamiento en detalle para la eliminación de la atrazina mediante la dechloración en aguas superficiales y subterráneas (*Mandelbaum et al., 1995*).

Es la cepa bacteriana mejor caracterizada capaz de degradar el herbicida atrazina hasta la mineralización completa. Las vías catabólicas de la atrazina en esta bacteria contienen seis pasos enzimáticos codificados por los genes *atzABC* y el *atzDEF*. Los genes *atzABC* han demostrado ser mayoritarios en un importante número de bacterias aisladas (*Souza et al., 1998*).



Las *Pseudomonas sp.* strain ADP han sido utilizadas en numerosos estudios de laboratorio. Por ejemplo, para el control del nitrógeno en la atrazina se han utilizado *Pseudomonas sp.* strain ADP, concluyendo que la presencia de fuentes de nitrógeno preferencial (amonio, urea, nitrato y prolina) en el medio ambiente va en detrimento de la degradación de la atrazina (García-González *et al.* (2003)).

La mineralización de atrazina en condiciones desnitrificantes también se ha estudiado con *Pseudomonas sp.* strain ADP, sembrando esta cepa en los sedimentos del acuífero se produce la degradación de la atrazina y la desnitrificación del nitrato (Shapir *et al.* 1998). En este caso, el citrato fue requerido para promover los procesos biológicos. El citrato actúa como un donador de electrones para estimular tanto la mineralización de la atrazina como la desnitrificación, mientras que el nitrato sirve como receptor de electrones alternativos para „respiración anaeróbica“

Se estudió la remoción simultánea de la atrazina y el nitrato de cultivo continuo de esta cepa bacteriana en un reactor de lecho fluidizado y quimiostatos (Katz *et al.* 2000a, 2000b, 2001). Se observó que citrato, fosfato y cloruro de sodio se presentan en el medio de cultivo y que sólo en condiciones de crecimiento estéril, la capacidad de degradación de atrazina podría mantenerse en niveles elevados.

La eficiencia de la degradación anóxica de la atrazina también se deterioró con el tiempo en reactores de lecho fluidizado, sin embargo, en un reactor biológico de carbón activado granulado se mantuvo (Herzberg *et al.* 2004).

Al mismo tiempo, se estudió la capacidad de degradación de la atrazina en el suelo utilizando para ello, *Pseudomonas sp.* strain ADP, *Pseudaminobacter sp.* y *Nocardioides sp.* (Topp 2001). Estas bacterias son todas ellas degradadoras de atrazina mediante el mecanismo de declorodación y degradan la atrazina con actividades específicas comparables.



El *Pseudoaminobacter* y *Nocardioides* puede utilizar la atrazina como única fuente de carbón y de nitrógeno, mientras que las *Pseudomonas* pueden utilizar el único compuesto como fuente de nitrógeno.

Las *Pseudomonas* y *Pseudaminobacter* mineralizan el compuesto, y el producto final del metabolismo de atrazina por *Nocardioides* es la N-ethylammelide.

Se estudia también la degradación de atrazina por un consorcio simple de *Klebsiella* sp. A1 y *Comamonas* sp. A2 a escala de laboratorio como alternativa a las otras cepas bacterianas (Yang *et al.* 2010). A diferencia de muchos otros microorganismos se observó, que fueron insensible a algunos compuestos nitrogenados por lo que la capacidad de degradación de atrazina no se perdió en la presencia de urea, $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ y $2\text{HPO}_4 (\text{NH}_4)$.

Pseudomonas sp. strain ADP y *Chelatobacter heintzii* fueron estudiados mediante PCR en tiempo real (Devers *et al.* 2004). Con estas cepas bacterianas se observó que los genes de atz se expresan y están regulados en función del tratamiento con atrazina.

Aparte de estas cepas, otras cepas bacterianas se han aislado de suelos y sedimentos contaminados con atrazina, aunque no se han utilizado en cultivos puros (Vargha *et al.*, 2005). Entre estos, hay informes sobre la degradación de atrazina por cepas individuales como *Rhodococcus rhodochrous*, *Acinetobacter* spp., *Aerobacterium* sp., *Microbacterium* sp., *Bacillus* sp., *Micrococcus* sp., *Deinococcus* sp. y *Delftia acidovorans*, así como por consorcios de especies, incluyendo *Agrobacterium tumefaciens*, *Caulobacter crescentus*, *Pseudomonas putida*, *Sphingomonas yanikuyae*, *Nocardia* sp., *Rhizobium* sp., *Flavobacterium oryzihabitans* y *Varioboraz paradoxus* (Sene *et al.*, 2010).

En este proyecto se han tomado *Pseudomonas* sp. strain ADP, simplemente porque se necesitaba una cepa bacteriana capaz de degradar la atrazina sin ninguna otra especificación y se decidió trabajar con ella al igual que el resto de los otros grupos de investigación que trabajan en ello simultáneamente a este proyecto.



Se realizan varios experimentos con porcentajes diferentes de solución salina de Israel, la que a partir de este momento se referenciará con las siglas GW, de groundwater, y la solución salina comercial 465. El objetivo de la realización de estos experimentos con porcentajes de una solución y la otra es ir acostumbrando de forma gradual a las bacterias *Pseudomonas sp.* strain ADP a salinidad de la solución del emplazamiento para comprobar su efectividad en relación a la capacidad de degradación de atrazina y para posteriormente poder ser utilizados en ello.





5.- Procedimiento experimental:

5.1.- Fundamentos extracción en fase sólida

La Extracción en Fase Sólida (SPE, de sus siglas en inglés solid phase extraction) es una potente y simple técnica de concentración y de limpieza de muestras que es, al mismo tiempo, rápida y económica. La utilización de la extracción en fase sólida ha permitido disponer de un método adecuado para aislar y purificar compuestos químicos presentes en matrices complejas, siendo un sistema rápido y reproducible.

Una columna SPE consiste en un lecho de adsorbente de partículas gruesas mantenido entre dos discos porosos en un tubo desechable. El método de SPE permite la preconcentración de la muestra con un riesgo mínimo de pérdida o contaminación de la misma. El componente de interés resulta retenido en una fase sólida mientras que los contaminantes de la matriz se eluyen finalmente a otra fase que facilita su análisis.

La SPE se ha aplicado como técnica de purificación de muestras, enriquecimiento de trazas y como procedimiento rápido de separación. Siendo los campos de aplicación:



<i>Fármaco</i>	<i>Clínica</i>	<i>Alimentación y agricultura</i>	<i>Medio ambiente</i>
-Extracción de componentes activos -Análisis farmacéuticos -Péptidos -Preparativa de muestras farmacéuticas	-Drogas terapéuticas y de abuso -Ciclosporina, esteroides, metabolitos de la vitamina D, lípidos, caltecolaminas, triglicéridos, etc.	-Limpieza de muestras complejas -Extracción en petroquímica, ácidos, bases, aceites de pescado, tejidos vegetales y otros analitos químicos y biológicos	-Sedimentos -Vegetales -Tejidos animales y sueros -Análisis de aguas residuales y superficiales -Residuos de pesticidas, herbicidas y contaminantes

En la figura 5.1 se muestra una fotografía del dispositivo utilizado para el procedimiento de extracción, consiste en una cámara de vidrio en la que se puede realizar un vacío capaz de impulsar las disoluciones y la muestra a través de los cartuchos de extracción.

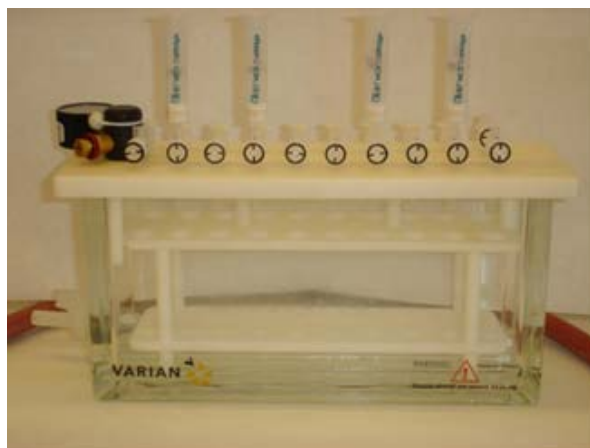


Figura 5.1: Dispositivo extracción en fase sólida



Las etapas más comunes en el proceso de SPE son las siguientes:

1. Activación. El primer paso es la activación en la que se utiliza un solvente orgánico para "humidificar" la fase.

2. Acondicionamiento. La fase estacionaria SPE se acondiciona con el mismo solvente de la matriz. El acondicionamiento permite "alineal" la fase estacionaria lejos de la superficie de la sílice, permitiendo la interacción entre el analito y la fase estacionaria. Cualquier solvente orgánico residual se elimina en esta etapa, asegurando que los componentes de interés sean retenidos en la parte superior de la columna.

3. Retención. Las interacciones entre las moléculas de la muestra y la fase estacionaria controlan la retención en el adsorbente de SPE. Para maximizar las interacciones, la muestra debe cargarse en el adsorbente de SPE a aproximadamente 3 ml/min. Este caudal puede controlarse mediante una válvula en la estación de vacío. Los componentes de interés han de retenerse en el adsorbente de SPE mientras que la matriz y los contaminantes deben eluirse y descartarse.

4. Eliminar interferencias. Usando un solvente o una serie de solventes de fuerza creciente los contaminantes pueden eliminarse del adsorbente de SPE hasta que solo los analitos de interés queden atrapados.

5. Elución. La elución de los analitos se efectúa mediante un eluyente adecuado. El adsorbente de SPE y las interacciones analito-adsorbente determinan el eluyente final de elución.

6. Evaporación. Se trata básicamente de la evaporación del eluyente utilizado en la etapa anterior para quedarse únicamente con el analito en tubo de evaporación.

7. Reconstitución. Disolver el analito, generalmente, en la fase móvil utilizada en la técnica de análisis final.



A continuación, se muestran un esquema de las principales etapas de la extracción en fase sólida:

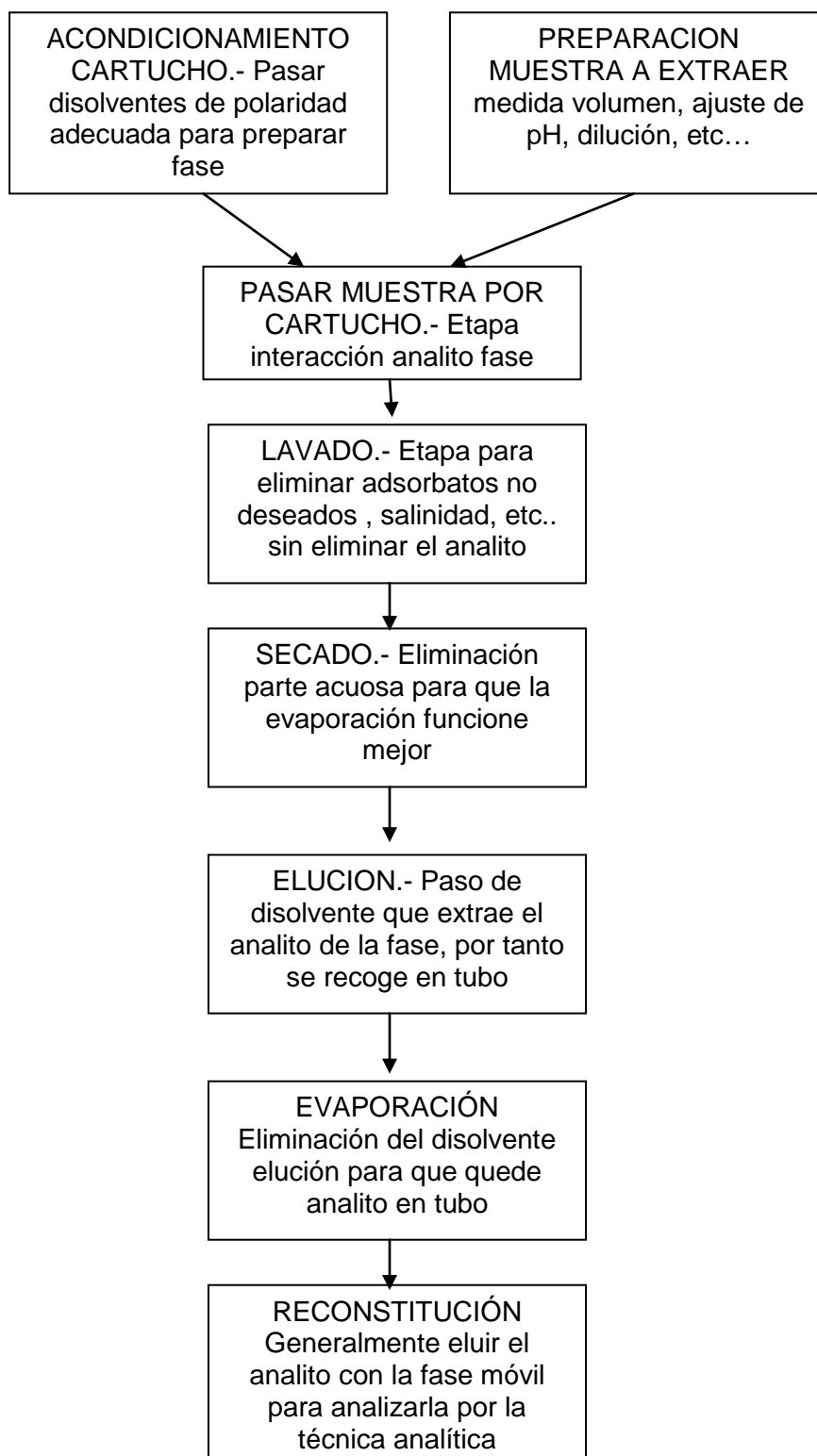


Figura 5.2: Etapas principales de extracción en fase sólida.



Se muestra, seguidamente, una fotografía de los “cartuchos” utilizados para el procedimiento de extracción,

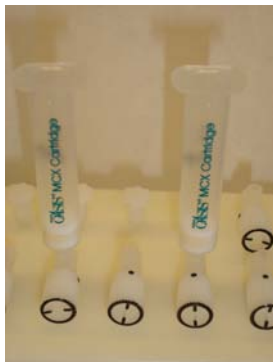


Figura 5.3: Cartuchos Oasis MCX Waters, utilizados para extracción en fase sólida.



5.2.- Fundamentos de la cromatografía líquida de alta eficiencia, HPLC

La Cromatografía líquida de alta eficacia o *High performance liquid chromatography* (HPLC) es un tipo de cromatografía en columna utilizada frecuentemente en bioquímica y química analítica.

Es una técnica cromatográfica usada para separar componentes de una mezcla basándose en los diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica. Básicamente, es un sistema compuesto de un reservorio de fase móvil, bomba, inyector, columna de separación y detector (ver figura 5.4).

Se hace circular al compuesto por la columna cromatográfica a través de la fase estacionaria mediante su bombeo a alta presión. La muestra a analizar es introducida en pequeñas cantidades y sus componentes se retrasan diferencialmente dependiendo de las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria.

El grado de retención de los componentes de la muestra depende de la naturaleza del compuesto, de la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil. El tiempo de retención se considera una propiedad identificativa y característica de un compuesto en una determinada fase móvil y estacionaria.

La utilización de presión en este tipo de cromatografías incrementa la velocidad lineal de los compuestos dentro la columna y reduce así su difusión dentro de la columna mejorando la resolución de la cromatografía.

Los disolventes más utilizados en la fase móvil son el agua, el metanol y el acetonitrilo. Una mejora introducida a la técnica de HPLC descrita es la variación en la composición de la fase móvil durante el análisis, conocida como *elución en gradiente*. Un gradiente normal en una cromatografía de fase reversa puede empezar a un 5% de acetonitrilo y progresar de forma lineal hasta un 50% en 25



minutos. El gradiente utilizado varía en función de la hidrofobicidad del compuesto. El gradiente separa los componentes de la muestra como una función de la afinidad del compuesto por la fase móvil utilizada respecto a la afinidad por la fase estacionaria. Utilizando un gradiente agua/acetonitrilo los compuestos más hidrofílicos eluirán a mayor concentración de agua, mientras que los compuestos más hidrofóbicos eluirán a concentraciones elevadas de acetonitrilo.

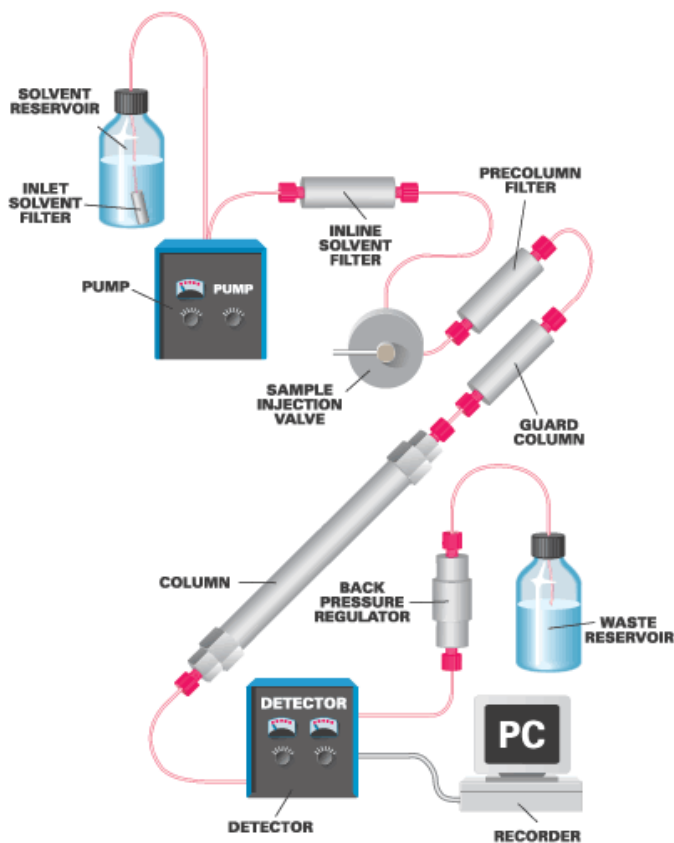


Figura 5.4: Esquema del sistema de cromatografía líquida de alta eficiencia, HPLC.



5.3.-Metodología Experimental

5.3.1.- Reactivos:

Todos los reactivos utilizados, salvo especificación han sido de Scharlau.

Reactivos soluciones salinas

- Reactivos de solución salina 465

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

KH_2PO_4

Trace Element Solution SL-4

- Reactivos solución salina Israel, GW

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

KCl

$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

NaCl

NaHCO_3

Na_2SO_4

NaBr

Reactivos proceso de extracción

Metanol, Extrapure, Scharlau

HCl 1 M

Acetonitrilo, gradient 240 nm/ far UV, HPLC grade, Scharlau

Metanol

Diclorometano

NH_4OH

HCl 0.1 N

Reactivos preparación de experimentos batch

Atrazina, 99,5 % 0,25 g; Dr Ehrenstorfer

Formaldehído



5.3.2.-Preparación de las soluciones salinas

Se preparan las soluciones salinas con las que posteriormente se trabaja en los experimentos batch para seguir la biodegradación de la ATZ en presencia de la cepa bacteriana *Pseudomonas sp.* strain ADP obtenida del DSMZ, The German Resource Center for Biological Material y la cepa bacteriana extraída del propio emplazamiento.

Se trabaja con dos soluciones salinas diferentes una de ellas más concentrada que la otra. La denominada solución salina 465, solución recomendada para el cultivo de *Pseudomonas sp.* strain ADP según especificaciones del DSMZ, solución de mediana salinidad, y la solución salina que reproduce la salinidad del medio indígena, mucho mayor que la de la anterior a la que se denominará como solución salina de Israel, GW.

- Solución salina 465

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3,50g
KH_2PO_4	1,00g
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,10g
Trace Element Solution SL-4	1,00mL
Agua bidestilada mQ	hasta 1000,00 g en peso

- Trace Element Solution SL-4

EDTA	0,50g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,20g
Trace Element Solution SL-6	100,00g
Agua bidestilada mQ	900,00g



- Trace Element Solution SL-6

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,10g
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,03g
H_3BO_3	0,30g
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,20g
$\text{CuCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,01g
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,02g
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,03g
Agua bidestilada mQ	hasta 1000,00g en peso

• Solución salina Israel (GW)

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4,283g
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,742g
NaHCO_3	1,611g
NaBr	2,292g
KCl	0,1g
NaCl	7,466g
Agua bidestilada mQ	hasta 1000,00g en peso

Se toman los reactivos necesarios, se pesan las cantidades estipuladas en la báscula analítica y se añaden paulatinamente en una botella de 1l de volumen colocada sobre una balanza para poder rellenarla a continuación con agua destilada hasta 1kg (adición del disolvente por pesada). Se puede introducir la botella en ultrasonidos facilitando así la disolución de las sales en el agua destilada.



La materia orgánica necesaria para el desarrollo de los microorganismos en la solución salina 465 se obtiene mediante la adición de citrato sódico, 1g/l. Esta nueva solución salina que tiene como base la solución salina 465 con citrato sódico se denomina 465i y es realmente la solución salina de trabajo.

Para esterilizar la disolución se realiza filtración a vacío de la misma mediante filtro de membrana estéril de 0,2µm de Nylon y se introduce una vez filtrada, en una botella previamente esterilizada en el autoclave para evitar así la proliferación de bacterias no deseadas.

El proceso de filtración se realiza en condiciones estériles en cabina de flujo laminar asegurando así dichas condiciones.



5.3.3.- Preparación de solución madre y patrones ATZ

Se preparan la solución madre de atrazina y los patrones de diferentes concentraciones conocidas con los que posteriormente se trabajará tanto para la obtención de la recta patrón, como en la preparación de los experimentos de biodegradación e interacción con biocarriers.

Es necesario trabajar a temperaturas bajas para mantener el metanol y que no se evapore. Por ello las botellas en donde se guardarán tanto la solución madre como los diferentes patrones se refrigeran con anterioridad en el congelador. Se trabaja en una sala a una temperatura de 20°C.

A continuación, en la figura 5.5, se muestra el árbol de dilución utilizado en la obtención a partir de la solución madre, de los patrones de diferentes concentraciones.



- **Árbol de dilución de Patrones**

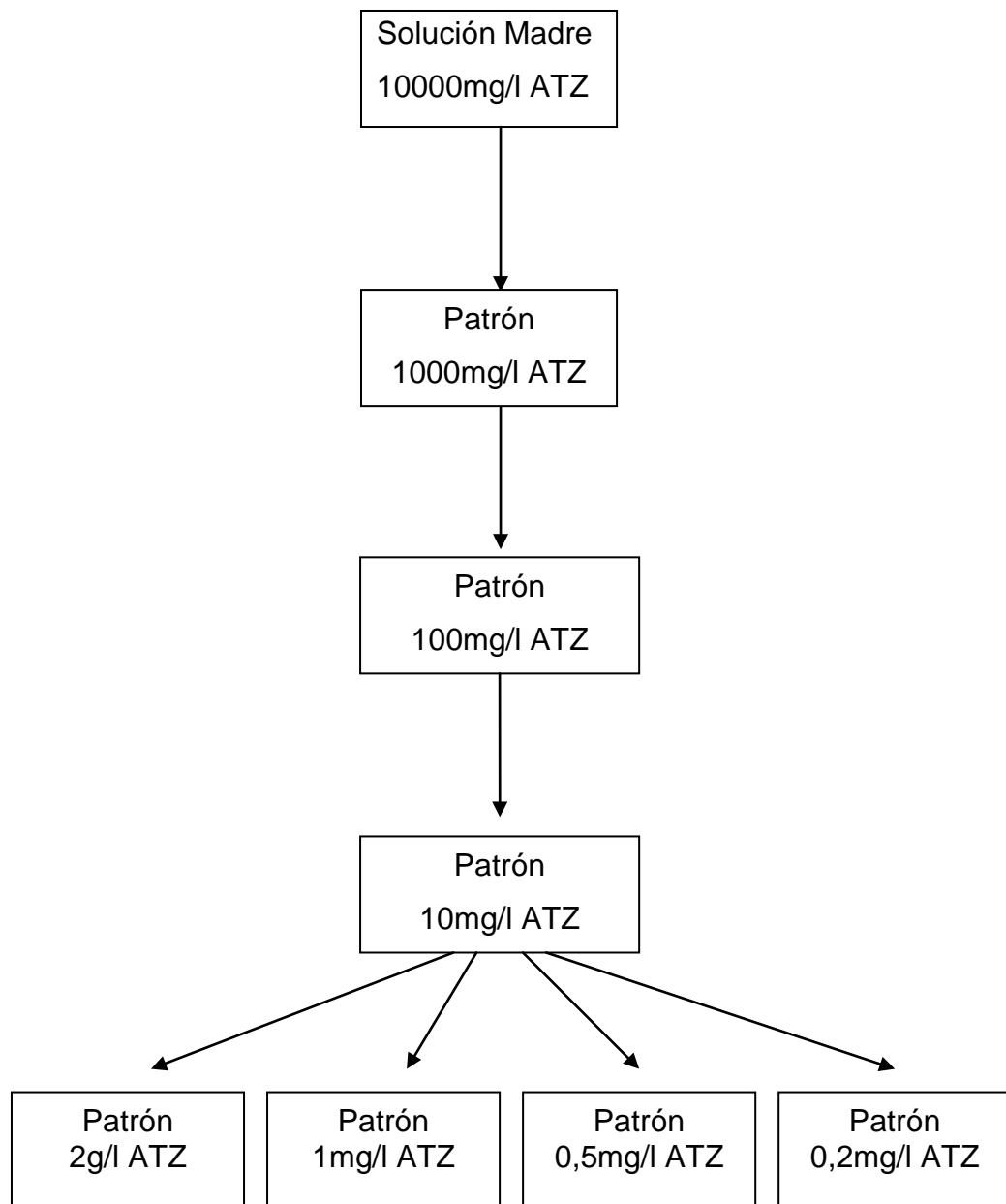


Figura 5.5: Árbol de dilución de solución madre y patrones atrazina, ATZ.



La solución madre de 10000mg/l se prepara a partir de la pesada de 0,05 g de atrazina en polvo (ATZ) que se disuelven en 5ml de metanol (MeOH). Siguiendo el árbol de dilución representado en la figura 5.5, a partir de la solución madre, se prepara la disolución de 1000mg/l, también por pesada.

Hasta ahora los patrones se han calculado por pesada, teniendo en cuenta la densidad del metanol. Para el cálculo de los sucesivos patrones, en vez de por pesada, se realizará por volúmenes con la ayuda de matraces aforados de distintos volúmenes.

Para obtener los sucesivos patrones el procedimiento siempre es el mismo, se toma la cantidad necesaria del patrón de concentración superior, indicado para cada caso en el árbol de dilución construido, figura 5.5, y se enrasa el matraz aforado con metanol en el caso de los patrón de 100mg/l ATZ y con Fase Móvil, FM, (35%Acetonitrilo-65% Agua) para el resto de los patrones.



5.4.4.- Analisis HPLC, recta patrón.

La cromatografía líquida de alta resolución utilizada, se basa en una fase estacionaria de carácter apolar y en una fase móvil de carácter polar. El disolvente de la fase móvil de carácter polar fué un gradiente de acetonitrilo al 35% y la fase estacionaria de carácter apolar fué agua milliQ al 65%.

Se utilizó una columna de fase reversa, MediterraneaSea18 5µm de 25x0,46 mm y con una longitud de onda de $\lambda=220\text{nm}$

A continuación, se muestra un ejemplo de recta de calibración diariarimente utilizada.

Tabla 5.1: Concentración de los patrones de la recta patrón y su área correspondiente obtenida por HPLC. (Entendiendose área corregida, Ac, como el cociente entre el área y el tiempo correspondiente a cada concentración)

<i>Concentración (mg/l)</i>	<i>Área</i>	<i>Tiempo</i>	<i>Área Corregida Ac</i>
10	4655,6	23,2	200,9
8	3546,0	23,1	153,2
5	2264,3	23,2	97,8
2	864,0	23,1	37,4
1	433,6	23,1	18,8
0,5	212,8	23,1	9,2
0,2	84,4	23,1	3,7
0,1	42,6	23,0	1,9



Representando estos datos se obtiene la siguiente recta patrón:

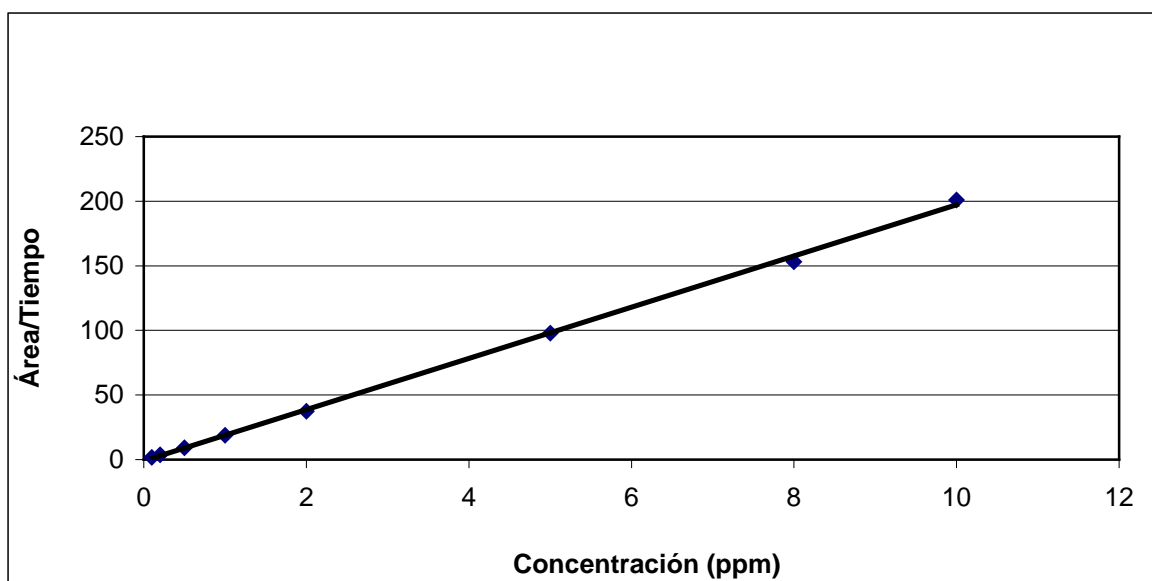


Figura 5.6: Representación gráfica de la concentración de los correspondientes patrones frente a su área/tiempo obtenida mediante análisis de HPLC

La relación entre la concentración de los patrones y el área/tiempo que se obtiene por análisis con HPLC es la siguiente:

$$\text{Área Corregida (Ac)} = \text{Pendiente} \cdot \text{Concentración} + \text{ordenada}$$

Con un coeficiente de regresión, R^2 .

Los patrones que componen la recta de calibración o recta patrón se analizaron frecuentemente para poder obtener una relación fiable entre el valor del área corregida, obtenida por análisis de HPLC, y la concentración. En la tabla 5.2, se puede comprobar la constancia de los valores característicos de la recta (pendiente y ordenada) y el coeficiente de regresión (R^2).



El intervalo de medida estuvo comprendido entre 0,1 y 10mg/l, por lo tanto, el intervalo de linealidad cubre como mínimo dos órdenes de magnitud, siendo el límite de cuantificación de orden 0,1mg/l.

Tabla 5.2: Constancia de los valores característicos de la recta patrón.

<i>Fecha</i>	<i>Pendiente</i>	<i>Ordenada en el origen</i>	<i>Coeficiente de regresión R^2</i>
29.04.2011	19,820	-1,039	0,9991
01.06.2011	18,843	0,317	0,9994
09.06.2011	19,019	0,780	0,9995

Con estos resultados se puede asumir la constancia de los valores de los patrones de la recta y por tanto se puede validar el método como el procedimiento adecuado para la determinación de la concentración de atrazina en los experimentos en batch durante la experimentación.



5.3.5.- Optimización extracción en fase sólida, SPE

Uno de los puntos más importantes de este estudio es el proceso de optimización de la extracción en fase sólida. Es necesario obtener un protocolo de actuación, válido y consistente para poder analizar los experimentos que se realizan posteriormente.

Se realiza un estudio detallado y aislado de las principales etapas teóricas del proceso de extracción en fase sólida y se optimiza finalmente el proceso general parte por parte. El proceso de optimización consta de varias etapas las cuales se detallan en los apartados siguientes.

5.3.5.1.- Optimización etapa de evaporación

En primer lugar se evalúan las etapas finales de la extracción en fase sólida, es decir, etapas de evaporación y reconstitución.

Para ello, se preparan unos 20 ml de mezcla 1:1 volumen de di-cloro-metano y metanol, DCM-MeOH, y otros 20 ml de fase móvil, FM.

Por un lado, a partir de un patrón 100 mg/l ATZ en MeOH se preparan:

- Una disolución de 20 mg/l ATZ en MeOH (1 ml patrón 100 mg/l ATZ en MeOH enrasado en un matraz de 5 ml con MeOH)
- 1 patrón de 1 mg/l en FM (100 microlitros patrón 100 mg/l ATZ en MeOH en matraz de 10 ml enrasando con FM)

Es muy importante que el origen de todos los patrones sea el mismo patrón de concentración superior.



Por otro lado, se preparan 6 tubos de evaporación de vidrio roscado con tapón:

- Añadir en cada tubo de evaporación 100 microlitros de patrón 20 mg/l ATZ en MeOH, utilizando la misma pipeta que en la preparación de la fase móvil.
- Añadir a 3 tubos 5 ml MeOH y a los otros 3 tubos 5 ml disolución MeOH-DCM (1:1 volumen) y agitar.
- Sobre estas muestras aplicar el siguiente esquema.

EVAPORACIÓN tubos a 45°C con N₂ a sequedad

RECONSTITUCIÓN Con 2 ml de FM (35% ACN 65% H₂O MilliQ) en vortex 30 segundos y análisis HPLC

En la evaporación se vigilan salpicaduras y se anota el tiempo que tarda el contenido de los tubos en evaporarse y si la disolución MeOH-DCM tarda menos que MeOH. Se marca también con rotulador el nivel inicial del disolvente. En la redisolución se debe vigilar si el vortex alcanza el nivel marcado de disolvente inicial y respetar el tiempo de vortex. Si el vortex no alcanza el nivel se ha de reportar. Por último se evalúa la recuperación y se comprueba si está entre 90-110 % y además, se debe comprobar también si el coeficiente de variación, es decir, la desviación típica dividida por el promedio, CV (%), de las 3 réplicas es inferior al 10%.

Si la recuperación no es buena se debe optimizar la etapa de reconstitución y si el problema es el CV que no es bueno, entonces se podría optimizar el proceso mediante el uso de un patrón interno.



5.3.5.2.- Optimización de etapa de reconstitución

En el apartado anterior, 5.3.5.1, se especificaba que si la recuperación obtenida no era la que se esperaba se debía optimizar la etapa de reconstitución. Los pasos a seguir en dicha optimización se explican y muestran a continuación:

Se prepararan 20 ml de dos fases móviles, por un lado 35% ACN y 65% H₂O MilliQ y por otro lado 50% ACN y 50% H₂O MilliQ.

Se toman 12 tubos de evaporación de vidrio roscados con tapón y en cada uno de ellos se añaden 20 µl de patrón de concentración 20 mg/l de atrazina, ATZ.

EVAPORACIÓN tubos a 40°C con N₂ a sequedad

RECONSTITUCIÓN Con 2 ml de FM y en vortex probar
3 tubos FM (35% ACN) y vortex 30 segundos, enviar
3 tubos FM (35% ACN) y vortex 1 minuto, enviar
3 tubos FM (50% ACN) y vortex 1 minuto, enviar
3 tubos FM (50% ACN) y vortex 30 segundos, enviar y sobre los mismos tubos añadir otra vez FM y enviar nuevamente para comprobar que la segunda extracción con FM es limpia

En la redisolución es importante de nuevo, vigilar si el vortex alcanza el nivel marcado de disolvente inicial y respetar el tiempo de vortex. Se evalúa la recuperación y se ve si está entre 90-110 % y además, se comprueba si el CV (%) de las 3 réplicas es inferior al 10%. Es importante, asegurarse que el vial de la segunda extracción está limpio.



Si se alcanzan los objetivos, repetir el apartado 5.3.5.1 con las nuevas condiciones. Si por el contrario los objetivos no se alcanzasen, sería necesario revisar evaporación, disoluciones, pipeteo, etc... utilizados para descartar errores de experimentación y no de protocolo.

5.3.5.3.-Optimización del patrón interno.

En el apartado 5.3.5.1, se especificaba que si el coeficiente de variación, CV (%) obtenido no era bueno, es decir, variabilidad elevada en los resultados, y por lo tanto resultados no consistentes, se debía optimizar la etapa de reconstitución y concretamente utilizar un patrón interno. El procedimiento a seguir en el caso de la optimización del patrón interno es la siguiente:

Se prepara una disolución 10 mg/l de fenantreno en fase móvil para evaluar el tiempo de retención. Para la obtención de esta disolución se parte de una disolución madre metanólica aproximadamente de 1000 mg/l y se obtiene por dilución de 0.1 a 10 ml en fase móvil. Para finalizar se utiliza el mismo método para HPLC utilizado para la atrazina con el objetivo de situar el tiempo de retención.

5.3.5.4-Optimización protocolo extracción.

Si en el proceso inicial, apartado 5.3.5.1, en la optimización de las etapas de evaporación y reconstitución, los valores obtenidos son óptimos, entonces es necesario determinar el tipo de cartucho que se utilizará en la SPE y optimizar su esquema de trabajo, es decir, optimizar el resto del proceso de extracción, figura 5.2.

Se dispone de dos tipologías de cartuchos, ambos adecuados para la extracción de la atrazina. Se tiene por una parte cartuchos Oasis HLB 3cc Waters y por otra cartuchos Oasis MCX 6cc Waters. Se optimiza el proceso de extracción para cada uno de ellos por separado y después se compara la eficacia entre ellos. Sólo se trabaja con un tipo de cartucho, en este apartado, basandose en los datos



obtenidos, se toma la decisión de cual de los dos tipos de cartuchos se utilizará para el análisis de los experimentos posteriores.

El esquema para la optimización del proceso de extracción para cartuchos Oasis HLB 3cc Waters, se detalla a continuación, figura 5.7



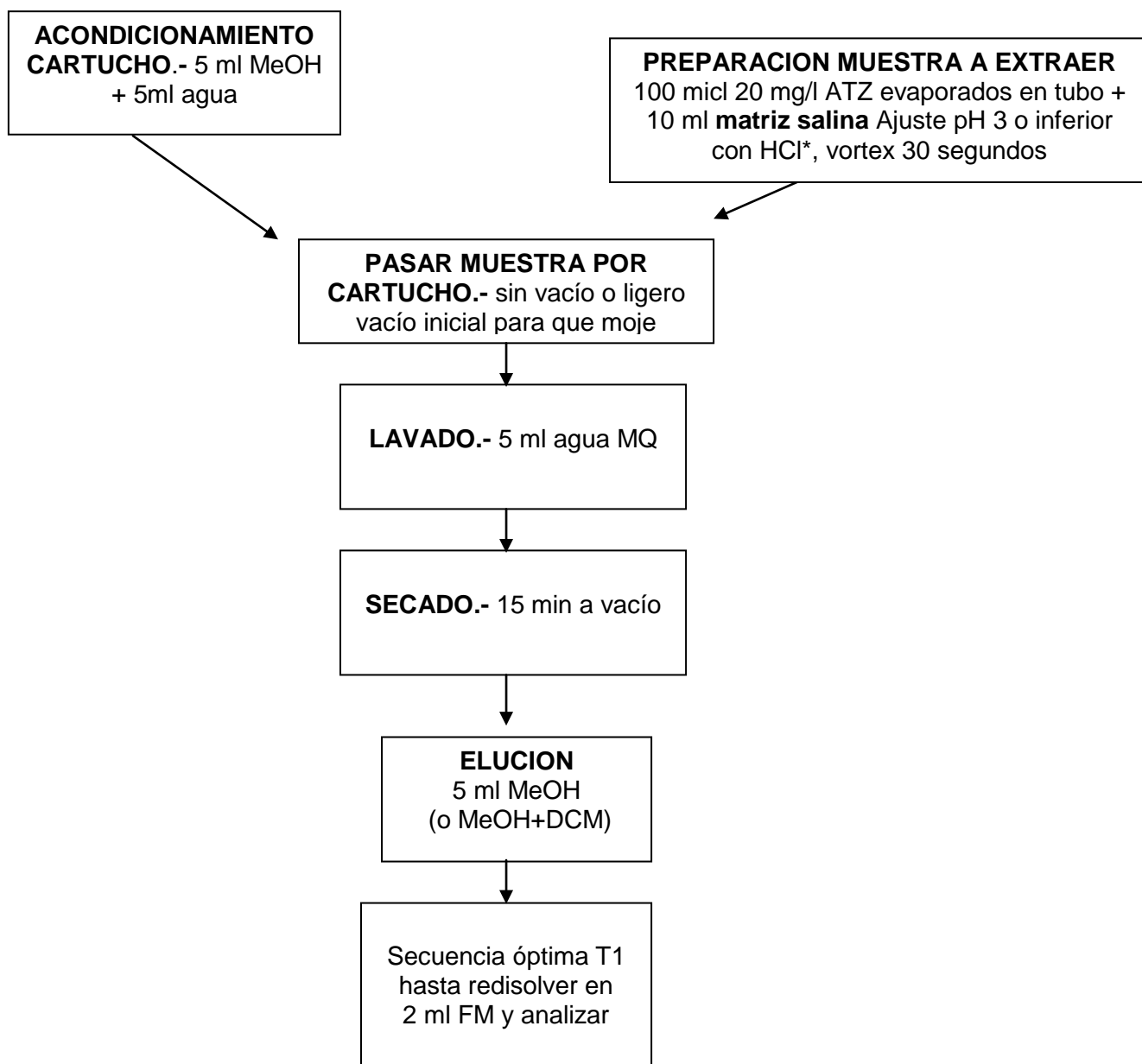


Figura 5.7: Optimización proceso de extracción Oasis HLB 3cc Waters

Las etapas que se han seguido en el proceso de extracción concretamente para los cartuchos Oasis MCX 6cc Waters, se muestran a continuación, figura 8.



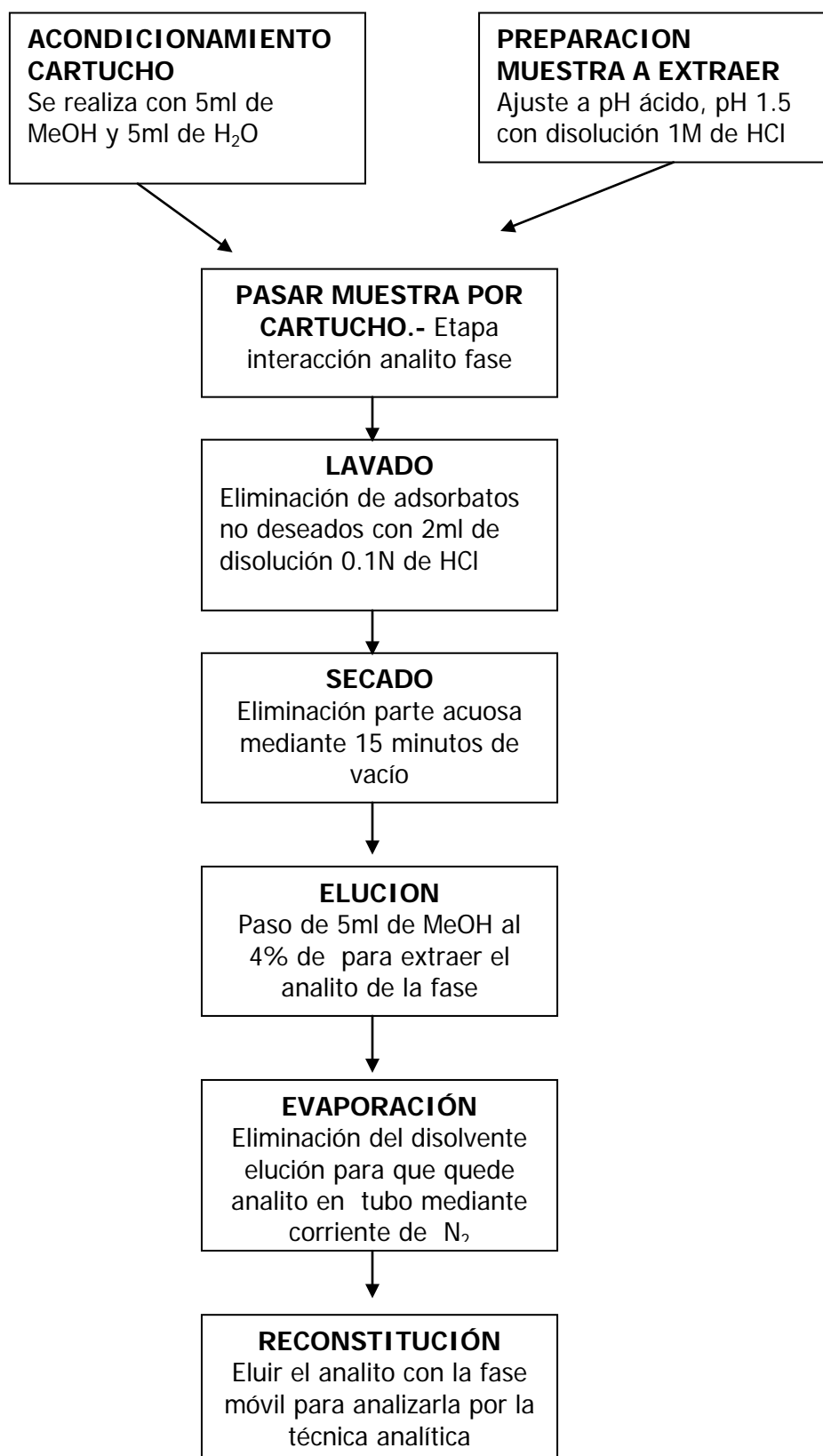


Figura 5.8: Optimización proceso de extracción Oasis MCX 6cc Waters



Las recuperaciones obtenidas durante el proceso de optimización de los protocolos de extracción para ambos cartuchos, cartuchos Oasis HLB 3cc Waters y cartuchos Oasis MCX 6cc Waters, se muestran a continuación, tabla 5.3.

Tabla 5.3: Recuperaciones obtenidas durante el proceso de optimización de SPE.

<i>Muestra</i>	<i>Área</i>	<i>Tiempo</i>	<i>Área corregida</i>	<i>Recuperación</i>
MCX	243	23,0	10,6	69,8
MCX	292,3	22,9	12,7	84,0
HLB	230,5	23,0	10,0	66,2
HLB	270,6	23,0	11,8	77,6

En base a estos resultados, tabla 5.3, en este estudio, se decantó por la utilización de cartuchos Oasis MCX 6cc Waters y su respectivo protocolo de extracción, figura 5.8, para la extracción de atrazina en los experimentos posteriores.





6.- Estudio de la biodegradación de la atrazina mediante *Pseudomonas* sp. strain ADP

6.1.- Diseño experimental y metodología

Para el estudio de la biodegradación de la atrazina en muestras de agua salina subterráneas contaminadas con dicho pesticida se desarrollan una serie de experimentos y se escoge la cepa bacteriana *Pseudomonas* sp. strain ADP basándose en la reputada bibliografía consultada como microorganismos capaces de biodegradar el pesticida.

El diseño experimental que se utilizó en el desarrollo de estos experimentos se describe a continuación y se muestra de forma esquematizado en la tabla 6.1.

Tabla 6.1: Esquema del procedimiento para el montaje de los experimentos batch con cepa bacteriana *Pseudomonas* sp. strain ADP.

	Biótico A	Biótico B	Biótico C	Control muerto	Abiótico
Medio salino, 465i (ml)	100	100	100	100	100
ATZ (mg/l)	10	10	10	10	10
Solución madre 1000 mg/l (ml)	1	1	1	1	1
Bacterias (ml)	0,1	0,1	0,1	0,1	0
Formaldehído (ml)	0	0	0	0,1	0

Se tienen por tanto 3 réplicas bióticas, un control muerto y un control abiótico (control muerto al que se añade un producto tóxico para inhibir o matar las bacterias, en este caso, formaldehído y control abiótico al que no se añade ningún microorganismo).

Se realizan estos dos controles para poder estudiar profundamente las posibles reacciones abióticas que puedan afectar a la atrazina, en especial la



precipitación. Anteriormente se ha comentado la baja solubilidad de la atrazina en agua, apenas 33 mg/l, tal y como se puede ver en los datos facilitados en la tabla 4.1, siendo de esperar que aún sea menos soluble en las soluciones salinas.

Se toman cinco matraces Erlenmeyer, previamente limpios y esterilizados en el autoclave para evitar la proliferación de microorganismos o bacterias no deseadas.

En cada uno de estos experimentos batch se tiene una concentración de atrazina de diseño de 10mg/l. Para ello se carga 1ml de solución madre 1000mg/l, se deja que el metanol se evapore por completo y a continuación se añaden 100ml de solución salina correspondiente. Para asegurar la completa disolución de la atrazina en la solución salina se deja toda una noche.

Por último se añade la cantidad de microorganismos adecuada a cada uno de los experimentos batch y se inicia la toma de muestras y su posterior análisis. Se saca muestra al inicio de la experimentación así como durante la misma.

Este diseño experimental se aplica a diversos tipos de disoluciones en un orden secuencial adecuado para aclimatar los microorganismos desde la disolución recomendada (50% de 456i en agua) hasta lo más cercano a la disolución representativa del agua subterránea (GW).

Se comienza con 50% de 456i y 50% de agua desionizada, si se observa degradación de atrazina se pasa a un 100% 465i, de nuevo, si se obtuviese degradación de atrazina, se pasa a un 80% 465i y 20% GW y así sucesivamente hasta conseguir que los microorganismo se adapten y sean capaces de degradar la atrazina en unas condiciones similares a las del emplazamiento real.

A continuación se muestra una imagen de los dispositivos para llevar a cabo dichos experimentos de biodegradación de la atrazina.



Figura 6.1: Dispositivos experimentales batch.



6.2.- Resultados

- **Solución salina composición 50% 465i y 50% agua desionizada (S1, conductividad 2.67mS/cm).**

Se prepara la solución 465 tal y como se indicó en el capítulo 5.3.2 y se añade materia orgánica necesaria para el buen crecimiento y desarrollo de los microorganismos. La materia orgánica utilizada es el citrato sódico y la cantidad necesaria es de 1g por litro de disolución siguiendo las indicaciones del DSMZ.

Se mezclan los porcentajes adecuados de solución salina 465i y agua bidestilada, se filtra y se preparan los 5 experimentos batch.

El experimento se inicia el 30/03/2011, se saca muestra de cada uno de los 5 experimentos, antes y después de añadir las bacterias, y se analiza la concentración de atrazina inicial mediante SPE y HPLC.

Se vuelve a sacar muestra pasados unos días y se analizan mediante SPE y HPLC. El procedimiento en general, es ir sacando muestra de los experimentos pasados unos ciertos días después del inicio del experimento para ir siguiendo y comprobando la degradación de la atrazina por acción de los microorganismos.

Lo que interesa es que estas concentraciones iniciales disminuyan con el tiempo, lo que indicaría que los microorganismos son capaces de degradar la atrazina en las condiciones experimentales.

Teniendo en cuenta únicamente las concentraciones y el tiempo transcurrido entre la toma inicial, intermedia y final se tienen los datos que se muestran en la tabla 6.2:



Tabla 6.2: Concentración de atrazina en experimentos batch en función del tiempo para solución salina S1.

	30/03/2011	30/03/2011	1/04/2011	8/04/2011
<i>Tiempo (días)</i>	0	0	2	9
<i>Biótico A</i>	5,8	5,5	5,4	<0.02
<i>Biótico B</i>	6,8	7,3	6,1	<0.02
<i>Biótico C</i>	6,6	6,8	7,8	<0.02
<i>Control muerto</i>	6,8	5,7	6,5	6,2
<i>Abiótico</i>	6,1	6,2	7,0	6,5

Si estos datos se representan gráficamente, se observa como la atrazina desaparece con el tiempo por la acción de los microorganismos.

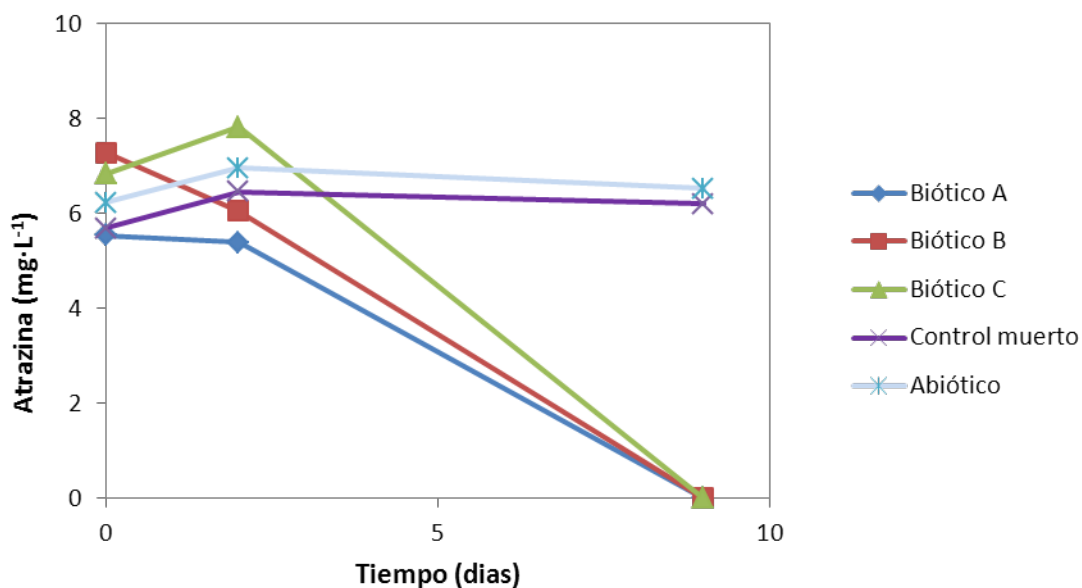


Figura 6.2: Representación gráfica de la degradación de la atrazina con el tiempo por el efecto de los microorganismos para solución salina S1.

De estos datos y resultados se puede extraer y asumir que los microorganismos son capaces de biodegradar la atrazina presente en las muestras y



por lo tanto, es posible la continuación de los experimentos y adaptación de los microorganismos al medio natural final caracterizado por una mayor salinidad.

Además, se observa que la concentración inicial se mantiene constante con independencia de si la muestra ha sido tomada antes o después de haber añadido las bacterias o microorganismos.

Por ello, a partir de este momento, únicamente se trabajará con una muestra inicial extraída después de la adición de las bacterias.



-Solución salina 100% 465i (S2, conductividad 4,67mS/cm).

Se prepara la solución 465 tal y como se indicó en el capítulo 5.3.2 y se añade materia orgánica necesaria para el buen crecimiento y desarrollo de los microorganismos.

Se filtra y se preparan, de nuevo, los 5 experimentos batch, ahora utilizando las bacterias de los experimentos con solución salina S1 ya adecuadas al medio, se trata simplemente de la inoculación de 0,1ml de los experimentos en batch con solución salina S1.

El experimento se inicia el 14/04/2011, se saca muestra de cada uno de los 5 experimentos y se analiza la concentración de atrazina inicial.

Se vuelve a sacar muestra pasados unos días y se analizan mediante extracción en fase sólida, SPE.

Teniendo en cuenta únicamente las concentraciones y el tiempo transcurrido entre la toma inicial y final se tienen los datos que se muestran en la tabla 6.3.

Tabla 6.3: Concentración de atrazina en experimentos batch en función del tiempo para solución salina S2

	06/05/2011	10/05/2011
<i>Tiempo (días)</i>	0	11
<i>Biótico A</i>	6,0	<0,5
<i>Biótico B</i>	7,4	<0,5
<i>Biótico C</i>	7,3	<0,5
<i>Control muerto</i>	6,5	6,5
<i>Abiótico</i>	9,1	8,8



Si estos datos se representan gráficamente, se puede observar como la atrazina desaparece con el tiempo por la acción de los microorganismos, figura 6.3.

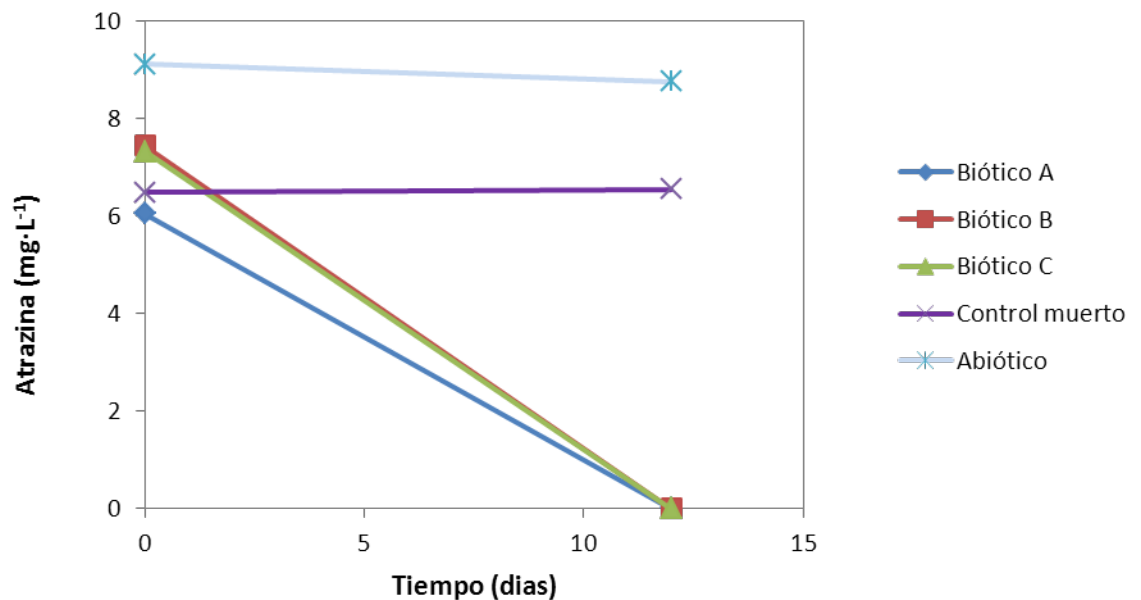


Figura 6.3: Representación gráfica de la degradación de la atrazina con el tiempo por el efecto de los microorganismos para solución salina S2.

Observando los datos y su representación gráfica conjuntamente se puede deducir y concluir que sí existe degradación de atrazina y como consecuencia se puede continuar con la adaptación de los microorganismos al medio.



- Solución salina composición 80% 465 y 20% GW (S3, conductividad 7.76mS/cm).

Se preparan ambas soluciones 465 y GW, se mezclan los porcentajes adecuados, se añade la materia orgánica necesaria, citrato sódico, se filtra y se preparan de nuevo los 5 experimentos batch, ahora utilizando las bacterias de los experimentos con solución salina S2, de nuevo se trata de inocular 0,1ml de bacht con solución salina S2.

El experimento se inicia el 06/05/2011, se saca muestra de cada uno de los 5 experimentos y se analiza la concentración de atrazina inicial. Se vuelve a sacar muestra pasados unos días y se analizan mediante extracción en fase sólida, SPE y posteriormente, mediante HPLC.

El procedimiento se basa en ir sacando muestra de los experimentos pasados unos ciertos días después de su inicio para ir siguiendo y comprobando la degradación de la atrazina como consecuencia de la presencia y acción característica de los microorganismos.

Teniendo en cuenta únicamente las concentraciones y el tiempo transcurrido entre la toma inicial y final se tienen los datos que se muestran en la tabla 6.4.

Tabla 6.4: Concentración de atrazina en experimentos batch en función del tiempo para solución salina S3.

	06/05/2011	10/05/2011
<i>Tiempo (días)</i>	0	4
<i>Biótico A</i>	5,6	<0,04
<i>Biótico B</i>	5,8	<0,04
<i>Biótico C</i>	5,7	<0,04
<i>Control muerto</i>	6,1	6,0
<i>Abiótico</i>	6,507	6,474



Representando gráficamente dichos datos, se puede observar como la atrazina disminuye su concentración con el tiempo debido a la acción de los microorganismos, figura 6.4.

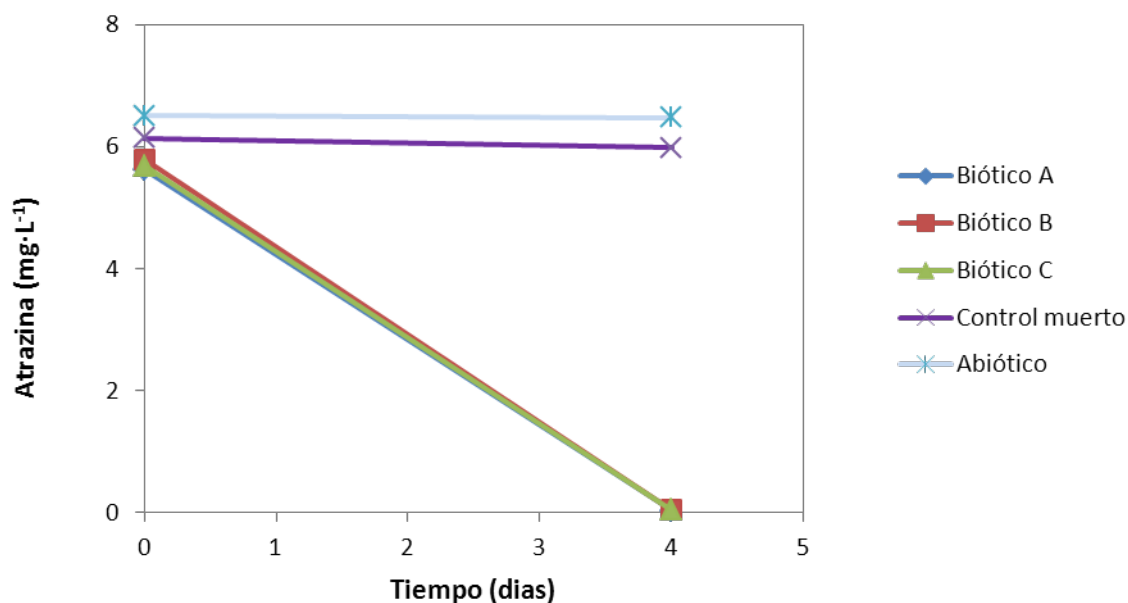


Figura 6.4: Representación gráfica de la degradación de la atrazina con el tiempo por el efecto de los microorganismos para solución salina S3.

A la vista de los datos obtenidos y su representación gráfica se puede deducir y concluir nuevamente que sí existe degradación de atrazina y como consecuencia se puede continuar con la adaptación de los microorganismos al medio.



- Solución salina composición 60% 465 y 40% GW (S4, conductividad 10,72mS/cm).

Se preparan las soluciones 465 y GW, se mezclan los porcentajes adecuados, se añade la materia orgánica necesaria, citrato sódico, se filtra y se preparan los 5 experimentos batch, ahora utilizando las bacterias de los experimentos Batch S3, ya adecuadas al medio.

El experimento se inicia el 16/05/2011, se saca muestra de cada uno de los 5 experimentos batch y se analiza la concentración de atrazina inicial.

Se saca muestra pasados unos días y se observa que aunque la concentración de la atrazina ha disminuido y se ha mantenido constante en los controles muerto y abiótico, es necesario dejar que los microorganismos continúen su crecimiento y desarrollo, por ello se saca muestra de nuevo pasados varios días más.

La acción degradadora de los microorganismos, al aumentar la presencia de sales, sigue siendo efectiva pero de forma un poco más lenta que para experimentos anteriores, es necesario ir sacando muestras intermedias para comprobar y seguir la degradación de la ATZ.

Teniendo en cuenta únicamente las concentraciones y el tiempo transcurrido entre la toma inicial, la intermedia y la final se tienen los siguientes datos recogidos en la tabla 6.5.



Tabla 6.5: Concentración de atrazina en batch en función del tiempo para solución salina S4.

	16/05/2011	19/05/2011	26/05/2011
<i>Tiempo (días)</i>	0	3	10
<i>Biótico A</i>	5,6	5,1	0,04
<i>Biótico B</i>	5,9	5,3	0,05
<i>Biótico C</i>	5,7	4,8	0,05
<i>Control muerto</i>	7,2	6,6	6,6
<i>Abiótico</i>	7,3	8,8	8,8

Si estos datos se representan gráficamente, se puede observar como la atrazina disminuye con el tiempo por la acción de los microorganismos, figura 6.5.

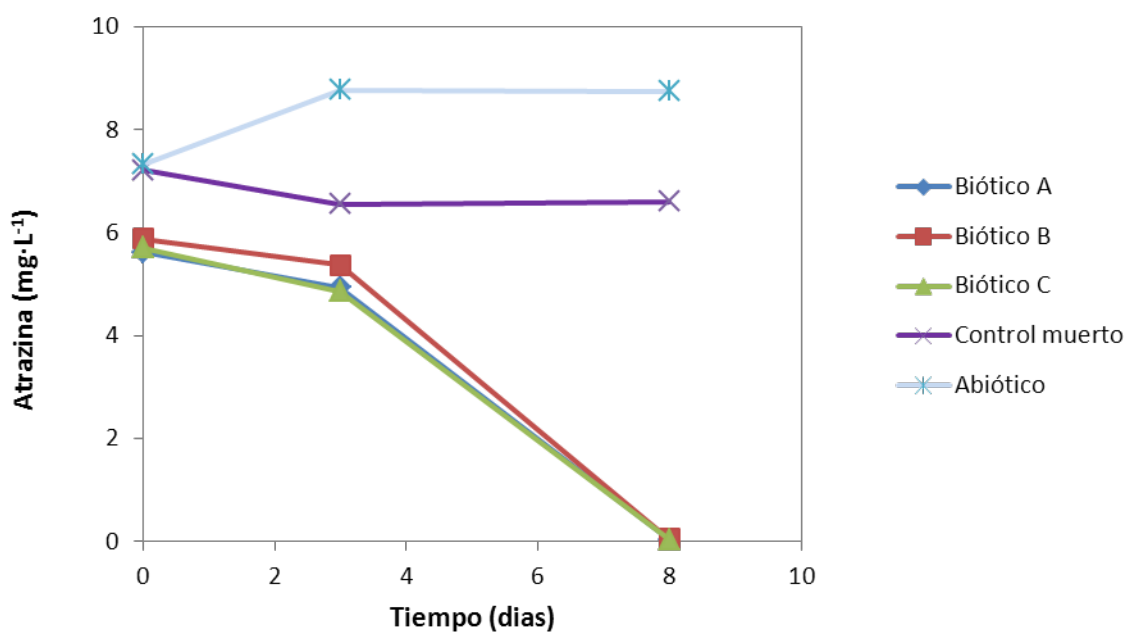


Figura 6.5: Representación gráfica de la degradación de la atrazina con el tiempo por el efecto de los microorganismos para solución salina S4.



De nuevo, observando los datos y su representación gráfica se puede deducir y concluir que sí existe degradación de atrazina y por lo tanto, se puede continuar con la adaptación o aclimatación de los microorganismos al medio salino.



- Solución salina composición 40% 465 y 60% GW (S5, conductividad 12,58 mS/cm).

Se preparan ambas soluciones 465 y GW, se mezclan los porcentajes adecuados, se añade la materia orgánica necesaria, citrato sódico, se filtra y se preparan de nuevo los 5 experimentos batch, ahora utilizando las bacterias de los experimentos con solución salina S4, ya adecuadas al medio.

El experimento se inicia el 26/05/2011, se saca muestra de cada uno de los 5 experimentos batch y se analiza la concentración de atrazina inicial. Se vuelve a sacar muestra pasados unos días y se analizan mediante extracción en fase sólida, SPE y posteriormente mediante HPLC.

Teniendo en cuenta únicamente las concentraciones y el tiempo transcurrido entre la toma inicial, la intermedia y la final se tienen los siguientes datos, tabla 6.6.

Tabla 6.6: Concentración de atrazina en batch en función del tiempo para solución salina S5.

	26/05/2011	1/06/2011	6/06/2011
<i>Tiempo (días)</i>	0	6	11
<i>Biótico A</i>	8,3	7,3	6,7
<i>Biótico B</i>	9,0	10,7	4,7
<i>Biótico C</i>	9,4	7,2	2,5
<i>Control muerto</i>	7,8	9,2	7,9
<i>Abiótico</i>	8,5	9,5	9,9

Si estos datos se representan gráficamente, se puede observar como la atrazina desaparece con el tiempo por la acción de los microorganismos, figura 6.6.



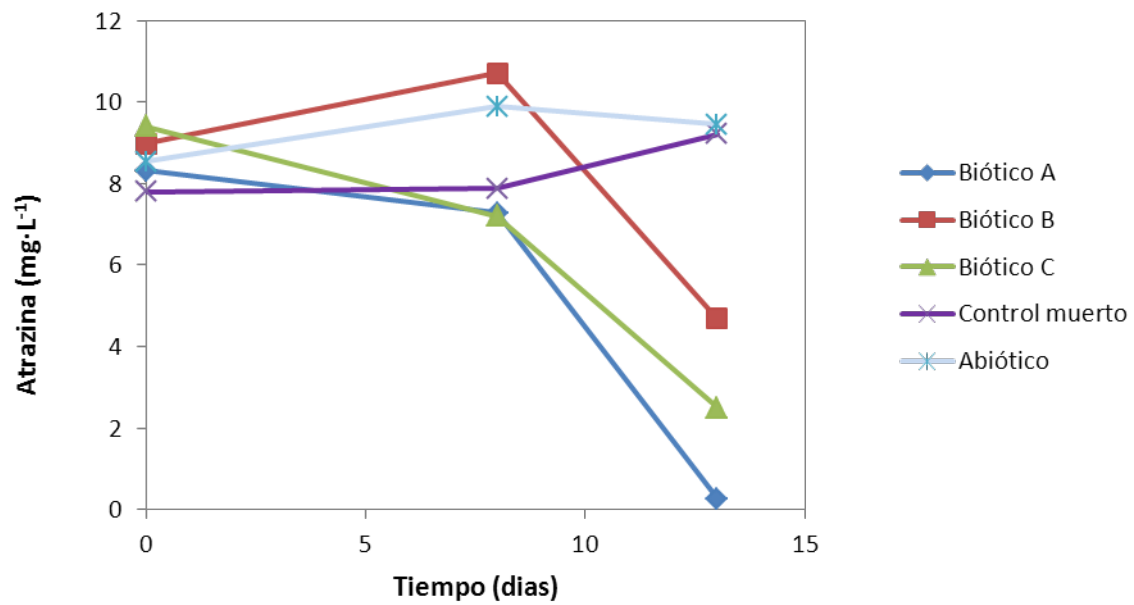


Figura 6.6: Representación gráfica de la degradación de la atrazina con el tiempo por el efecto de los microorganismos para solución salina S5.

La degradación no ha sido completa pero sí se puede observar una tendencia de reducción de la concentración de la atrazina y por lo tanto, asumir que los microorganismos son capaces y seguirán con su degradación.





7.- Estudio de la biodegradación de la atrazina mediante bacterias Indígenas

7.1.- Diseño experimental y metodología

Simultáneamente a los experimentos que se realizan con la cepa bacterial comercial *Pseudomonas sp.* strain ADP, se desarrollan otros experimentos en los que se utilizan bacterias indígenas que se han podido aislar del propio emplazamiento del caso de estudio del proyecto AQUAREHAB. Se trata de bacterias obtenidas a partir de pozos situados en un polígono industrial situado en el desierto del Negev en Israel.

El diseño experimental que se utilizó para estos experimentos se muestra en la tabla 7.1.

Tabla 7.1: Esquema del procedimiento para el montaje de los experimentos batch con bacterias Indígenas.

	Biótico A	Biótico B	Biótico C	Biótico D	Control muerto	Abiótico
Medio salino, GW (ml)	100	100	100	100	100	100
ATZ (mg/l)	10	10	10	10	10	10
Solución madre 1000 mg/l (ml)	1	1	1	1	1	1
Bacterias (ml)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0
Formaldehído (ml)	0	0	0	0	0,1	0

Se tiene por tanto 4 réplicas bióticas y un control abiótico y un control muerto (control al que se añade formaldehído para inhibir las bacterias).



El procedimiento para la preparación de los experimentos es la siguiente:

Se toman seis matraces Erlenmeyer, previamente limpios y esterilizados para evitar la proliferación de microorganismos o bacterias no deseadas.

En cada uno de estos experimentos batch se tiene una concentración de atrazina de diseño de 10mg/l, para ello se carga 1ml de solución madre de 1000mg/l, se deja que el metanol se evapore por completo y a continuación se añaden 100ml de solución salina 100% GW. Para el caso de las bacterias indígenas no es necesario realizar un proceso de adaptación a las condiciones salinas del emplazamiento real, pues estas provienen del mismo y por tanto se asume que ya están adaptadas al medio.

Estas bacterias Indígenas extraídas directamente del emplazamiento real, se han conservado congeladas a una temperatura de -80°C. Para su recuperación se deja que se descongelen lentamente introduciéndolas en la nevera a 4 °C y evitándose así un posible choque térmico a los microorganismo que podría dejarlos dañados o incluso matarlos.

Parte de estas bacterias se recuperan por centrifugación entre 8000-9000 rcf, eliminación del sobrenadante y por último resuspensión del *pellet* en medio salino GW, caso de los batch A, B y E, y otra parte se añaden directamente sin ningún tratamiento previo, caso de los batch C y D.



7.2.- Resultados

El procedimiento es idéntico al que se sigue con los experimentos de *Pseudomonas sp.* strain ADP. Se saca muestra de cada uno de los experimentos batch y mediante SPE y HPLC se analiza la concentración de la atrazina.

Algunas de las concentraciones o de los porcentajes de recuperación no son elevados. Esto se considera debido a posibles errores que se van acumulando en el proceso de extracción, posibles pérdidas durante todo el proceso, descartándose problemas de precipitación de sales y atrazina.

El protocolo de actuación se basa en dejar que los microorganismos crezcan y se desarrollen e ir extrayendo muestra para analizar la degradación o no de la atrazina.

Los experimentos se inician el día 14/04/2011, pasados unos días, el 26/04/2011, de nuevo se saca muestra y se analizan las muestras.

Se observa que no ha habido degradación, las concentraciones de atrazina en cada uno de los experimentos batch se mantienen constantes, figura 7.1.

Se deja que transcurra tiempo y pasados unos días se analiza de nuevo la composición de los experimentos batch y así sucesivamente hasta observar degradación o no de la atrazina.

Pasados unos 56 días comienza a producirse y hacerse notable la degradación de atrazina tal y como se puede observar en los datos recogidos en la tabla 7.2.



Tabla 7.2: Concentración de atrazina en los experimentos batch en función del tiempo.

	14.04.2011	26.04.2011	10.05.2011	26.05.2011	09.06.2011
<i>Tiempo (días)</i>	0	11	24	42	56
<i>Biótico A</i>	6,5	6,1	6,5	6,2	3,2
<i>Biótico B</i>	6,7	5,3	6,4	6,7	3,1
<i>Biótico C</i>	8,1	7,7	8,2	8,1	4,1
<i>Biótico D</i>	6,5	6,9	7,2	6,7	3,5
<i>Control Muerto</i>	7,1	5,4	7,4	7,9	6,6
<i>Abiótico</i>	9,5	7,7	9,6	9,7	10,9

Representando gráficamente estos datos, figura 7.1, se puede observar como la concentración de atrazina disminuye con el tiempo por acción de los microorganismos.

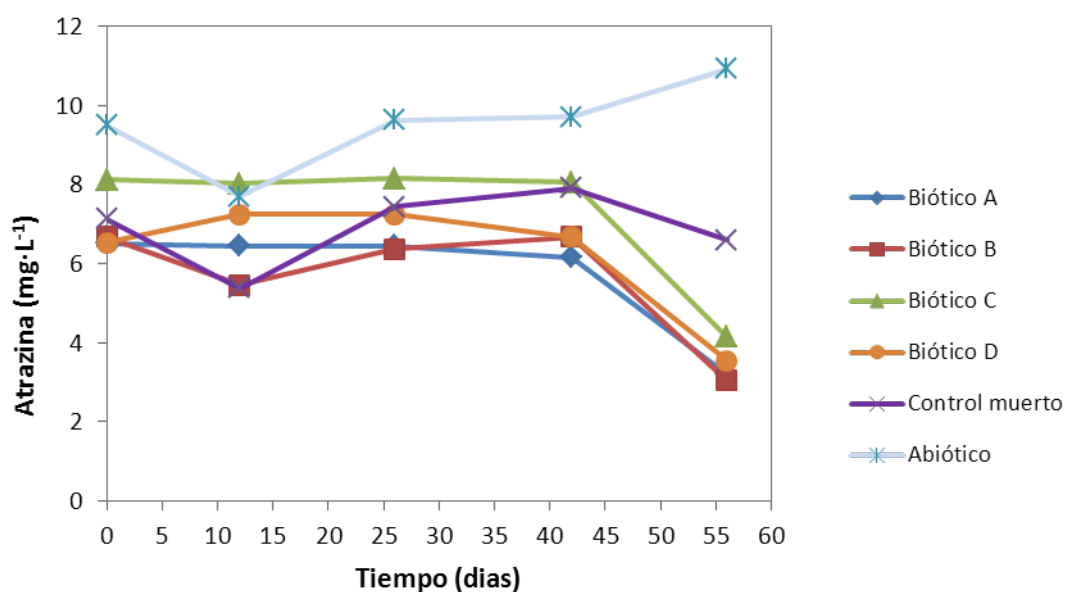


Figura 7.1: Representación gráfica de la degradación de la atrazina con el tiempo por el efecto de los microorganismos indígenas para solución salina de conductividad 19.27mS/cm, composición 100% GW.



Se puede observar una tendencia de disminución de concentración de atrazina con el tiempo para los experimentos bióticos y una constancia de la concentración de atrazina para los experimentos de control muerto y abiótico.

La biodegradación de la atrazina no ha sido completa, es necesario dejar transcurrir más tiempo para poder observar una disminución total de atrazina.

Cabe destacar que para ambos pretratamientos de bacterias, centrifugación o uso directo, se han obtenido los mismos resultados, es decir, no se observan diferencias notables entre los experimentos batch bióticos A, B y E, en los que las bacterias se han obtenido por centrifugación, y los experimentos batch bióticos C y D, en los que las bacterias se habían utilizado directamente.





8.- Experimentos con biocarriers

8.1.- Descripción del proceso

Se busca desarrollar y posteriormente evaluar, una serie de materiales basados en mezclas finales de carbón activado y carbonato de calcio, calcita, que una vez introducidos en aguas subterráneas de elevada salinidad, sean capaces de servir como soporte de microorganismos capaces estos últimos de biodegradar atrazina.

Los carriers se han fabricado a partir de la mezcla de cal, calcita, carbón activado y otros aditivos en proporciones adecuadas para obtener finalmente un biocarrier poroso con una composición final basada en una matriz de carbonato de calcio con carbón activado.

En este presente estudio, únicamente se comprueba si los materiales son capaces de incorporar, ya sea mediante adsorción o precipitación, sobre su superficie porosa todos aquellos nutrientes necesarios para el crecimiento y desarrollo óptimo de los microorganismos. La atrazina contiene ya nitrógeno carbono, por ello únicamente es necesario desarrollar un sistema para fijar fosfatos y materia orgánica

Para ello, se observa cualitativamente y cuantitativamente tanto las muestras sólidas como las soluciones salinas, al inicio y al final de la experimentación mediante experimentos abióticos.

Se basa en determinar si la concentración de fósforo y fosfatos se mantiene constante en la solución salina o si por el contrario ha disminuido y dicho fósforo y/o fosfatos se han adherido a la superficie porosa de los “carriers” como se deseaba y era de esperar, pudiendo comprobar esto mediante observación por SEM y determinación de composición del carrier por EDX.



Se prepara una solución salina cuya composición sería 50% solución salina 465i y 50% solución salina GW, dicha solución presenta una conductividad de 12,07 mS/cm y un pH neutro de 7,35, obtenido a partir de los fosfatos anadidos en solución salina 465i. Ambos valores fueron medidos a 25°C de temperatura.

Se toman tres botellas de 1l, las cuales previamente fueron limpiadas, secadas y finalmente esterilizadas en autoclave. Dos de ellas se rellenan con 200ml de solución salina de conductividad 12,07 mS/cm, estas botellas corresponderán a los experimentos designados con los nombres, Abiótico A y Abiótico B, y la tercera de las botellas representará un blanco experimental, rellenándose pues con agua milliQ y designándose como Abiótico C.

Se introducen en todas ellas el denominado “carrier”, siempre con cuidado y evitando que parte del material se pueda romper o desmembrarse por impacto contra las paredes o fondo de la botella.

Previamente a la introducción de “carrier” en cada una de las botellas, se saca muestra suficiente para analizar la cantidad de fósforo mediante analizador de flujo continuo segmentado (Seal analytical AA3), fosfatos mediante cromatografía iónica (Dionex ICS-2100), carbón orgánico total (TOC, mediante Shimadzu TOC 5050 analyzer), pH, mediante medición directa con un electrodo Crison (n° 52-02) acoplado a un pH-metro modelo Crison GLP22 y la conductividad, usando una celda Crison (n° 52-92) acoplada a un conductímetro Crison GLP32 a 25°C.

Por último se colocan las tres botellas en agitación constante en un agitador orbital y se dejana temperatura ambiente un par de días hasta la próxima extracción de muestra.



El aspecto de algunos de los carriers utilizados se muestra a continuación, a simple vista se puede notar su superficie porosa y no uniforme atribuido este aspecto, al proceso de carbonatación de los mismos.



Figura 8.1: Aspecto de los carriers utilizados



8.2.- Resultados

Para poder determinar cuantitativamente si los carriers son capaces de adsorber sobre su superficie porosa los nutrientes necesarios posteriormente para el desarrollo de los microorganismos, se determina la cantidad de fósforo total y fosfatos en la solución salina inicial y después se compara con la cantidad final.

Sólo la solución salina 465 aporta fósforo y/o fosfatos a la solución salina final, en forma de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y KH_2PO_4 .

La cantidad de fósforo total presente en la solución 465i sería de 837 mg P/l, pero como se trabaja con solución 50% 465i y 50% GW, la cantidad teórica, sería entonces de 419 mg P/ L.

Se supone que todo el fósforo esta en forma de fosfatos, pero para descartar la presencia del fósforo en otras formas, ésto se comprueba. La cantidad teórica de fosfatos presentes en la solución 465i es de 2566 mg PO_4^{-3} /L, por lo tanto en la solución con la que se trabaja, 50% 465i y 50% GW, la cantidad teórica, sería de 1283 mg PO_4^{-3} / L.

Tal y como se indica en el procedimiento experimental, se toma muestra de cada uno de los experimentos inicialmente y previamente a la introducción del carrier para análisis de los diferentes parámetros de interés (pH, conductividad, fósforo total, fosfatos y TOC).



Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla 8.1

Tabla 8.1: Valores iniciales, muestra tomada sin carrier en el interior, de los parámetros de estudio para cada uno de los experimentos abióticos.

	<i>Abiótico A</i>	<i>Abiótico B</i>	<i>Abiótico C</i>
<i>pH</i>	7,5	7,6	5,9
<i>Conductividad (mS/cm)</i>	11,6	11,7	1,6
<i>Fósforo total (mg P/l)</i>	411,2	410,2	<0,26
<i>Fosfatos (mg (PO₄)⁻³ /l)</i>	1306,1	1356,5	49,1
<i>TOC (mg/l)</i>	120,9	166,8	<15

Los valores obtenidos de fósforo total y fosfatos experimentalmente son próximos a los valores teóricamente esperados.

Tras cinco días a temperatura ambiente y manteniendo la agitación constante en los tres experimentos, se vuelve a sacar muestra y se analizan los parámetros de interés.



Tabla 8.2: Valores intermedios, muestra tomada con carrier introducido, de los parámetros de estudio para cada uno de los experimentos abióticos transcurrido un período de cinco días.

	<i>Abiótico A</i>	<i>Abiótico B</i>	<i>Abiótico C</i>
<i>pH</i>	7,7	7,7	10,5
<i>Conductividad (mS/cm)</i>	12,3	12,4	251 μ S/cm
<i>Fósforo total (mg P/l)</i>	358,0	368,2	<0,26
<i>Fosfatos (mg (PO₄)⁻³/l)</i>	1162,4	1136,3	49,1
<i>TOC</i>	103,5	146,2	<30

Se puede observar que se ha producido un pequeño aumento en la conductividad de la solución salina del medio pero quizás lo más destacable e importante es que ha tenido lugar una significativa disminución del fósforo total y fosfatos presentes en el medio lo que sugiere una adhesión de éstos al carrier o una precipitación en la disolución.

También es importante destacar una disminución de TOC en la solución, seguramente debido a la absorción de materia orgánica por el carrier o por precipitación del citrato de calcio, a pesar de que la solubilidad es aproximadamente de 1000 mg/l en agua

En el caso del experimento C, medio no tamponado, se observa un aumento de pH y se demuestra así, que no existe liberación de fósforo ni de carbono de la matriz.

Se deja que transcurran un par de días más para poder comprobar la continua disminución de fósforo y fosfatos en el medio, de nuevo se saca muestra de cada uno de los experimentos abióticos y se analizan dichas muestras, obteniéndose los



siguientes resultados para el transcurso concreto de 13 días desde el inicio de la experimentación.

En este último análisis no se realizó la cuantificación de fosfatos, ya que con los resultados de los análisis anteriores, tabla 8.1 y tabla 8.2, se comprobó que las cantidades de fósforo y fosfatos son equivalentes y que por lo tanto todo el fósforo esta en forma de fosfatos.

Tabla 8.3: Valores finales, muestra tomada con carrier introducido, de los parámetros de estudio para cada uno de los experimentos abióticos transcurrido un período de trece días.

	<i>Abiótico A</i>	<i>Abiótico B</i>	<i>Abiótico C</i>
<i>pH</i>	7,7	7,8	10,9
<i>Conductividad (mS/cm)</i>	11,7	11,9	251μS/cm
<i>Fósforo total (mg P/l)</i>	304,7	352,4	<0,26
<i>TOC</i>	88,4	143,8	<30

A la vista de estos resultados, se puede observar una nueva y fuerte disminución, en comparación con los valores iniciales, de fósforo presente en el medio. Una vez analizados cuantitativamente estos carriers, se procede al análisis cualitativo para poder comprobar si la disminución que existe de fósforo y fosfatos se corresponde con la dhesión de los mismos al carrier tal y como se desea que ocurra.

Se analizaron mediante SEM los carriers que habían sido introducidos en cada uno de los experimentos abióticos llevados a cabo y se obtienen los resultados que se muestran a continuación.



Mediante EDX se analiza uno de los carriers sin tratar. La figura muestra la zona dónde se hizo el EDX y en la tabla se destacan la composición de la zona, obteniéndose los siguientes resultados en cuanto a su composición, tabla 8.4.

Tabla 8.4: Composición de carrier sin tratar.

Element	App Conc.	Intensity Conn.	Weight%	Weight% Sigma	Atomic%
O K	1414.89	0.6499	60.47	0.45	78.73
Mg K	11.77	0.8075	0.40	0.08	0.35
Al K	33.65	0.8931	1.05	0.08	0.81
Si K	34.90	0.9528	1.02	0.08	0.75
Cl K	46.17	0.8767	1.46	0.09	0.86
K K	6.87	1.1647	0.16	0.07	0.09
Ca K	1297.68	1.0171	35.44	0.41	18.42
Totals			100.00		

La zona interior al recuadro violeta de la imagen se corresponde con la zona donde se realizó el EDX para conocer su composición.

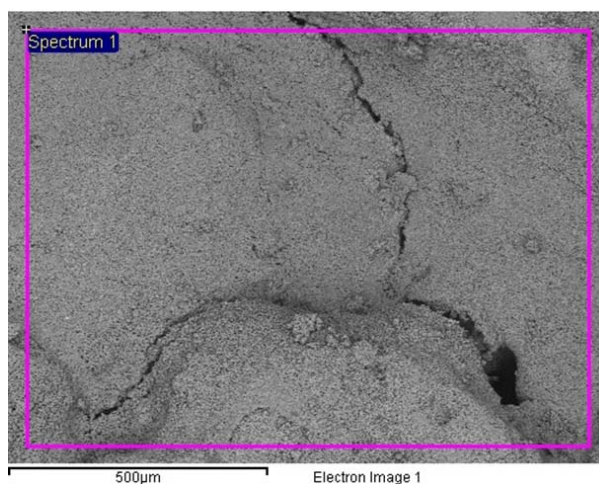


Imagen 8.1: Superficie carrier inicial sin tratamiento.

Se puede obtener un espectro donde aparecen representados los componentes así como sus porcentajes:



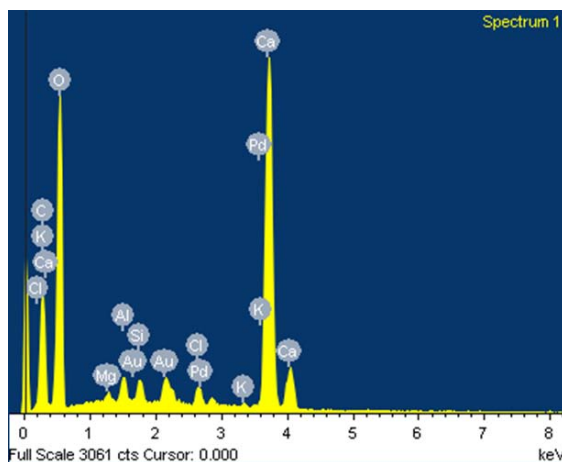


Imagen 8.2: Composición superficie carrier inicial sin tratamiento.

Se comprueba con este análisis que los carriers inicialmente no presentan trazas de fósforo ni fosfatos.

A continuación se muestran los valores obtenidos para el carrier tratado con solución salina de conductividad 12,07mS/cm.

Tabla 8.5: Composición final del carrier tratado con solución salina de conductividad 12,07mS/cm.

Element	App Conc.	Intensity Corrn.	Weight%	Weight% Sigma	Atomic%
O K	1358.74	1.1727	61.33	0.60	74.55
Na K	3.19	1.0239	0.16	0.14	0.14
Mg K	245.36	0.8951	14.51	0.33	11.61
Al K	7.51	0.8258	0.48	0.11	0.35
P K	334.20	1.3041	13.57	0.37	8.52
Cl K	2.12	0.7861	0.14	0.12	0.08
Ca K	180.97	0.9771	9.80	0.32	4.76
Totals			100.00		

En la imagen se muestra la zona dónde se realizó el EDX. En este caso se escogió un cristal de la superficie del carrier. Como además puede observarse en la



imagen, los cristales eran abundantes en los carriers sumergidos en la solución salina.

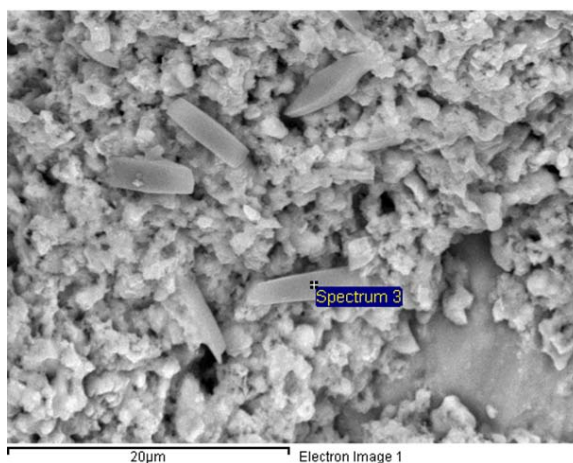


Imagen 8.3: Superficie final carrier tratado con solución salina de conductividad 12,07mS/cm.

Si se observa la imagen se pueden apreciar la formación de los pequeños cristales en forma de aguja con fósforo sobre la superficie.

Se comprueba la aparición de pequeños cristales de fosfatos de calcio que explicarían parcialmente la desaparición de P del análisis cuantitativo. La relación Ca/P disponible en la superficie es más elevada, y por ello se ha obtenido un precipitado de un fosfato de calcio en la misma.

El espectro con los porcentajes de los compuestos que conforman este carrier final se puede observar a continuación:



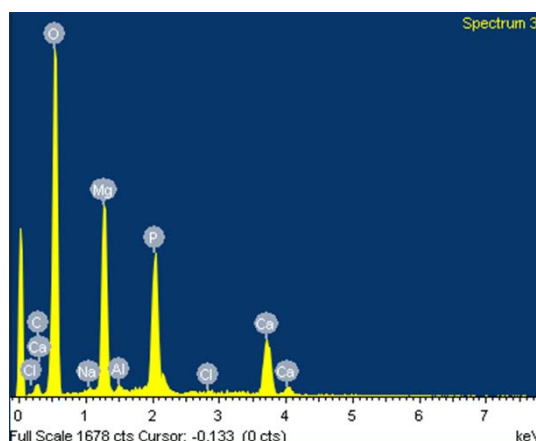


Imagen 8.4: Composición superficie final carrier tratado con solución salina de conductividad 12,07mS/cm.

En el espectro de la composición de este carrier se puede observar un pico de fósforo tal y como era de esperar y los datos cuantitativos sugerían.

Por último y para comprobar la fiabilidad de los resultados obtenidos, se adjuntan la composición, imagen de su superficie y espectro del carrier que había sido puesto en agua milliQ constituyendo éste un blanco experimental.

Tabla 8.6: Composición del carrier tratado con agua milliQ

Element	App Conc.	Intensity Conn.	Weight%	Weight% Sigma	Atomic%
O K	1544.89	0.6544	58.21	0.58	78.01
Mg K	7.43	0.8153	0.22	0.08	0.20
Al K	39.37	0.9031	1.08	0.09	0.85
Si K	65.50	0.9641	1.68	0.10	1.28
Cl K	14.48	0.8668	0.41	0.08	0.25
K K	6.52	1.1532	0.14	0.08	0.08
Ca K	1458.83	1.0194	35.29	0.49	18.88
Fe K	15.25	0.8078	0.47	0.20	0.18
Au M	74.45	0.7337	2.50	0.40	0.27
Totals			100.00		



A continuación se muestra en la imagen la zona dónde se realizó el EDX

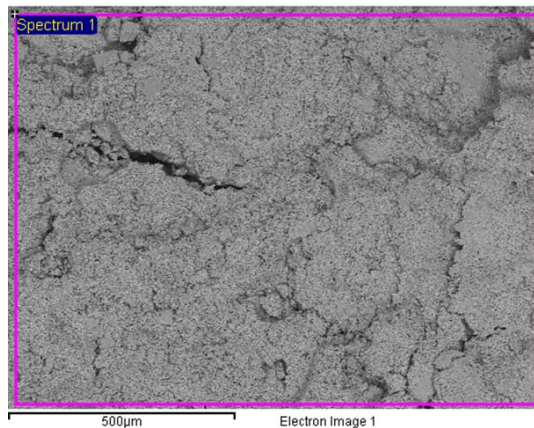


Imagen 8.5: Superficie final carrier tratado con agua MilliQ

Por último, se obtuvo el siguiente espectro asociado a la composición de su superficie,

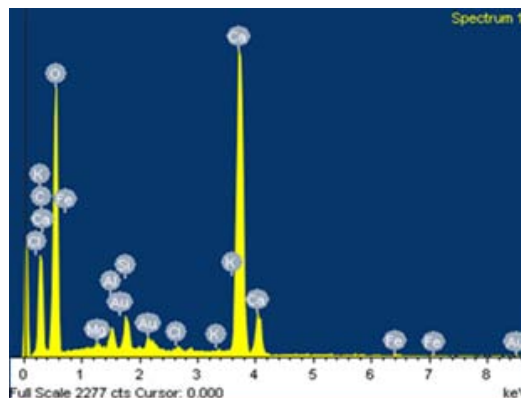


Imagen 8.6: Composición superficie final carrier tratado con agua MilliQ

Se puede observar en este último caso, carrier tratado con agua milliQ, que como era de esperar, tanto la imagen de la superficie del carrier como su composición son similares y coincidentes con las correspondientes a las del carrier inicial sin tratar.



Es necesario aclarar que existen variaciones en la composición de los carriers debido que aunque se consideran homogéneos existen ciertas desviaciones de dicha homogeneidad.

Existen pequeñas variaciones en cuanto a la cantidad de cada uno de los componentes pero estos componentes están presentes en todos y cada uno de los carriers a excepción del fósforo, que solo aparece en aquellos que han sido tratados previamente con solución salina de conductividad 12,07 mS/cm.

Estas pequeñas variaciones también se observan en un mismo carrier, varían aleatoriamente según en qué parte de la superficie se lleve a cabo el análisis.





9.- Evaluación económica

9.1.- Presupuesto del proyecto

El estudio se puede estructurar en 8 tareas básicas que cubren los siguientes períodos:

Tabla 9.1: Tareas de estructuración del estudio y su duración.

Tarea	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul
1 <i>Introducción bioaumentación</i>						
2 <i>Estado del arte</i>						
3 <i>Optimización SPE</i>						
4 <i>Estudio de la biodegradación de atrazina mediante sp.ADP</i>						
5 <i>Estudio de la biodegradación de atrazina mediante bacterias</i>						
6 <i>Indígenas</i>						
7 <i>Experimentos con biocarriers</i>						
8 <i>Estudio económico</i>						
9 <i>Redacción PFC</i>						

Para la realización del presupuesto del proyecto se han de tener en cuenta varios factores tales como, la inversión realizada en el equipo y material necesario para el desarrollo de los experimentos así como su mantenimiento, el coste de los recursos humanos según el tiempo empleado para el desarrollo del proyecto y el material de oficina utilizado en el mismo.



9.1.1.- Inversión en equipos y material de experimentación.

En la tabla 9.2 se muestra el coste de inversión realizada en el equipo y material necesario para el diseño y desarrollo de los experimentos así como para su mantenimiento.

Tabla 9.2: Coste de inversión en equipo y materiales

<i>Concepto</i>	<i>Coste (€)</i>
<i>Equipo (HPLC, TOC)</i>	5917
<i>Material vidreo y plástico (pipetas, puntas, filtros, cartuchos SPE)</i>	326,28
<i>Reactivos (soluciones salinas, atrazina, disolventes)</i>	306,91
<i>Cepa bacteriana (Pseudomonas sp. strain ADP)</i>	57
Total	6607,19

9.1.2.- Recursos humanos

La cuantificación del coste de los recursos humanos empleados se divide en el rango del ingeniero según si es junior o sénior facturando 20 €/h o 40 €/h respectivamente, todo ello se muestra en la siguiente tabla 9.3.

Se tienen en cuenta tales gastos tanto en la elaboración escrita del proyecto como en el proceso de investigación que se requirió, desarrollándose esta última parte de experimentación dentro de un proyecto europeo del 7º Programa Marco (AQUAREHAB) que se realiza en el departamento de ingeniería química de la UPC y Fundació CTM, Centre Tecnològic.



Tabla 9.3: Coste de recursos humanos

<i>Tarea</i>	<i>Nº de horas</i>	<i>Coste (€)</i>
<i>Introducción bioaumentación</i>	80	1.600
<i>Estado del arte</i>	160	3.200
<i>Optimización SPE</i>	128	2.560
<i>Estudio de la biodegradación de atrazina mediante Pseudomonas sp. strain ADP</i>	252	5.040
<i>Estudio de la biodegradación de atrazina mediante bacterias Indígenas</i>	104	2.080
<i>Experimentos con biocarriers</i>	48	960
<i>Estudio económico</i>	80	1.600
<i>Redacción PFC</i>	160	3.200
Total	1.012	20.240

9.1.3.- Material oficina

Durante la realización del proyecto han sido necesarios diferentes elementos de trabajo los cuales son mostrados en la tabla 9.4:

Tabla 9.4: Coste material oficina

	<i>Unidad (u)</i>	<i>Precio (€/u)</i>	<i>Coste (€)</i>
<i>Hojas de papel</i>	1000	0,03	30
<i>Cartucho de tinta</i>	2	30	60
<i>Compact Disc</i>	2	1	2
<i>Impresiones</i>	4	3	12
<i>Encuadernaciones</i>	4	3	12
Total			126



9.1.4.- Presupuesto global

El presupuesto global se puede dividir en dos. Por un lado, el presupuesto para el coste de inversión en equipos y materiales, tabla 9.5, y por otro lado el presupuesto por las horas y el trabajo, experimental e investigacional, realizado en el proyecto, tabla 9.6.

Tabla 9.5: Presupuesto coste de inversión en equipos y materiales de experimentación

<i>Concepto</i>	<i>Coste (€)</i>
<i>Gastos</i>	6607,19
<i>I.V.A (18%)</i>	1189,2942
Total	7.796,4842

Tabla 9.6: Presupuesto del trabajo realizado

<i>Concepto</i>	<i>Coste (€)</i>
<i>Recursos humanos</i>	20.240
<i>Material</i>	126
Total	20.366
<i>I.V.A (18%)</i>	3665,88
Total	24.031,88

En este tipo de proyectos y estudios es necesario tener en cuenta una serie de costes indirectos e imprevistos, los cuales, para este caso en concreto, se detallan a continuación:



Tabla 9.7: Costes indirectos

<i>Concepto</i>	<i>Coste (€)</i>
<i>Costes directos</i>	31.828,36
<i>Costes indirectos (60% directos)</i>	19.097,02
<i>Costes directos+indirectos</i>	50.925,38
<i>Imprevistos (15% anterior)</i>	7.638,81
Total	58.564,19
<i>I.V.A (18% anterior)</i>	10.541,55
Total con I.V.A	69.105,74





10.- Conclusiones

A partir del presente proyecto:

- Se ha puesto a punto una metodología de extracción de atrazina en agua salina que permite determinar un intervalo de concentraciones de 0.01mg/l como límite inferior de detección y 10 mg/l como límite superior, con una recuperación superior al 80%.
- En los experimentos con *Pseudomonas* sp. strain ADP se ha alcanzado una degradación de atrazina completa y total, detectandose concentraciones <0.01 mg/l de atrazina en las disoluciones. Dicha degradación se ve afectada con la salinidad del medio, es más lenta a medida que la salinidad aumenta.
- En los experimentos con cepas bacterianas aisladas del propio emplazamiento se ha observado degradación significativa a partir del día 56.
- Se han realizado experimentos abióticos en biocarriers minerales con agua salina sin atrazina y se ha observado la disminución de fosfatos y carbono orgánico total.
- Un estudio microscópico en los biocarriers antes y después del tratamiento con la disolución de cultivo permite determinar la presencia de cristales en forma de aguja ricos en fósforo que se asimilan a fosfatos. Ello indica la precipitación como posible mecanismo de fijación sobre la superficie del biocarrier.





11.- Referencias

- Devers, M., Soulas, G., & Martin-Laurent, F. (2004). Real-time reverse transcription PCR analysis of expression of atrazine catabolism genes in two bacterial strains isolated from soil. *Journal of Microbiological Methods*, **56** (1), 3-15.
- Dolaptsoglou, C., D. G. Karpouzas, et al. (2009). "Influence of Different Organic Amendments on the Leaching and Dissipation of Terbutylazine in a Column and a Field Study." *Journal of Environmental Quality* **38**(2): 782-791.
- Dousset, S., C. Mouvet, et al. (1997). "Degradation of [C-14]terbutylazine and [C-14]atrazine in laboratory soil microcosms." *Pesticide Science* **49**(1): 9-16.
- Garcia-Gonzalez, V., Govantes, F., Shaw, L.J., Burns, R.G., & Santero, E. (2003). Nitrogen control of atrazine utilization in *Pseudomonas* sp strain ADP. *Applied and Environmental Microbiology*, **69** (12), 6987-6993.
- Guzzella, L., S. Rullo, et al. (2003). "Studies on mobility and degradation pathways of terbutylazine using lysimeters on a field scale." *Journal of Environmental Quality* **32**(3): 1089-1098.
- Herzberg, M., Dosoretz, C.G., Tarre, S., Michael, B., Dror, M., & Green, M. (2004). Simultaneous removal of atrazine and nitrate using a biological granulated activated carbon (BGAC) reactor. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **79** (6), 626-631.
- Hildebrandt, A., S. Lacorte, et al. (2007). "Assessment of priority pesticides, degradation products, and pesticide adjuvants in groundwaters and top soils from agricultural areas of the Ebro river basin." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **387**(4): 1459-1468.
- Jones, T. W., W. M. Kemp, et al. (1982). "Degradation of Atrazine in Estuarine Water Sediment Systems and Soils." *Journal of Environmental Quality* **11**(4): 632-638.



- Katz, I., C. Dosoretz, et al. (2000a). "Simultaneous removal of nitrate and atrazine from groundwater." *Water Science and Technology* **41**(4-5): 49-56.
- Katz, I., Green, M., Ruskol, Y., & Dosoretz, C.G. (2000b). Characterization of atrazine degradation and nitrate reduction by *Pseudomonas* sp strain ADP. *Advances in Environmental Research*, **4** (3), 219-224.
- Katz, I., Dosoretz, C.G., Mandelbaum, R.T., & Green, M. (2001). Atrazine degradation under denitrifying conditions in continuous culture of *Pseudomonas* ADP. *Water Research*, **35** (13), 3272-3275.
- Mandelbaum, R. T., D. L. Allan, et al. (1995). "Isolation and Characterization of a *Pseudomonas* Sp That Mineralizes the S-Triazine Herbicide Atrazine." *Applied and Environmental Microbiology* **61**(4): 1451-1457.
- Navarro, S., N. Vela, et al. (2004). "Effect of temperature on the disappearance of four triazine herbicides in environmental waters." *Chemosphere* **57**(1): 51-59.
- Shapir, N., Mandelbaum, R.T., & Jacobsen, C.S. (1998). Rapid atrazine mineralization under denitrifying conditions by *Pseudomonas* sp. strain ADP in aquifer sediments. *Environmental Science & Technology*, **32** (23), 3789-3792.
- Syracuse Research Corporation's Interactive PhysProp Database,
<http://www.syrres.com/what-we-do/databaseforms.aspx?id=386>
- Souza de, M.L., Seffernick, J., Martinez, B., Sadowsky, M.J., & Wackett, L.P. (1998). The atrazine catabolism genes *atzABC* are widespread and highly conserved. *Journal of Bacteriology*, **180** (7), 1951-1954.
- Topp, E. (2001). "A comparison of three atrazine-degrading bacteria for soil bioremediation." *Biology and Fertility of Soils* **33**(6): 529-534.



- Vargha, M., Z. Takats, et al. (2005). "Degradation of atrazine in a laboratory scale model system with Danube river sediment." *Water Research* **39**(8): 1560-1568.
- Wackett, L. P., M. J. Sadowsky, et al. (2002). "Biodegradation of atrazine and related s-triazine compounds: from enzymes to field studies." *Applied Microbiology and Biotechnology* **58**(1): 39-45.
- Winkelman, D. A. and S. J. Klaine (1991). "Degradation and Bound Residue Formation of Atrazine in a Western Tennessee Soil." *Environmental Toxicology and Chemistry* **10**(3): 335-345.
- Yang, C.Y., Li, Y., Zhang, K., Wang, X., Ma, C.Q., Tang, H.Z., & Xu, P. (2010). Atrazine degradation by a simple consortium of *Klebsiella* sp A1 and *Comamonas* sp A2 in nitrogen enriched medium. *Biodegradation*, **21** (1), 97-105.





12.- Agradecimientos

Me gustaría agradecerles a todas aquellas personas que con su apoyo y amistad me han ayudado a llegar hasta aquí. A mis padres, hermana y demás familia por haber estado siempre a mi lado y por su apoyo incondicional en todo lo que he hecho así como en todas mis “aventuras”.

A mis amigos y amigas, compañeros de universidad, de piso y demás por todos los momentos que me han hecho disfrutar, sin ellos, estos años, no hubiese sido la persona tan feliz que he sido. A mi tutor, Vicens Martí, y a mi tutora Montse Calderer, no sabría como agradecerles toda su ayuda, paciencia, comprensión y generosidad que han tenido conmigo durante toda mi estancia en CTM así como todo el trabajo que me han ayudado a realizar durante la redacción de esta memoria.

También me gustaría agradecerles a mis compañeros de despacho, Laia, Gemma y de laboratorio Cristina, Laura, Neus, y general al todo el personal del CTM su actitud conmigo, que desde el primer día me acogieron como a una más, y por supuesto toda la ayuda mostrada durante mi estancia en CTM.

La lista de personas a las que me gustaría darle las gracias por ayudarme de una forma u otra a llegar hasta aquí y lo feliz que he sido además de lo mucho que he disfrutado durante todos estos años sería infinita, así que, lo resumo en un muchísimas gracias a todos!

Rocío



